



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACIÓN CITOGENÉTICA DEL CABALLO CRIOLLO COLOMBIANO

Silvia Elena Naranjo Elorza

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Escuela de Biociencias

Medellín - Colombia

2012

EVALUACIÓN CITOGENÉTICA DEL CABALLO CRIOLLO COLOMBIANO

Silvia Elena Naranjo Elorza

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Biotecnología

Director:

Juan Bautista López Ortiz. Biol. MSc.

Asesores:

María Elena Márquez Fernández. Biol. MSc cPhD
Francisco José Valencia Alaix. Zoot. MSc.

Línea de Investigación:

Citogenética

Grupo de Investigación:

Biotecnología Animal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Escuela de Biociencias

Medellín - Colombia

2012

*A mi madre, ejemplo de vida que me impulsa
a alcanzar mis sueños*

“Príncipe de la llanura, señor del viento, maestro de grandes empresas, amigo y sobretodo compañero. Tu incondicional entrega a la jornada, tu empeño en causas que no entiendes y tu inagotable energía catalizaron la historia humana; ganaste guerras, expandiste fronteras, domaste trochas, atajos y senderos. Pero ante todo cautivaste con tu brío, nobleza y belleza.”

Manuel Noriega

Agradecimientos

Son muchas las personas a las que quiero agradecer su colaboración en la realización de este trabajo,

Principalmente a mi madre por su amor, sus enseñanzas y su apoyo incondicional.

Al profesor Juan Bautista López Ortiz, por permitirme elaborar este proyecto desde cero, por su paciencia, por estar ahí cuando lo he necesitado, además de darme fortaleza en los momentos más difíciles.

A la profesora María Elena Márquez Fernández, por acogerme y brindarme su apoyo y colaboración en este proceso.

Al Dr. Francisco José Valencia Alaix por abrirme las puertas de su laboratorio General de Genética, por su colaboración, empeño, amistad y por confiar en mí, incluso más que yo misma.

A todos los miembros de la Clínica Veterinaria San Luis, por su entusiasmo y colaboración en la realización de este proyecto, por su ambiente ideal que siempre me hace querer estar allí.

A las personas del Criadero Nuevo mundo, por su genuino interés en este trabajo y su inmensa colaboración con la obtención de las muestras.

Al Dr. Juan Carlos Herrera, del laboratorio de Genética Médica de la U de A, por colaborar conmigo con las fotografías de los extendidos.

Al posgrado en Ciencias – Biotecnología, La Facultad de Ciencias y en general a la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, no solo por mi formación académica, también sentí su apoyo en los momentos que más lo necesité.

A mi gran amigo Andrés Pulgarín, por sus grandes aportes a este trabajo, por estar siempre ahí a pesar de la distancia.

A Catalina Pineda, por su amistad y por ser la primera persona en seguirme la corriente con la propuesta inicial de este trabajo

A Pablo Robledo, por estar a mi lado, por su apoyo y por darme la tranquilidad que tanto necesitaba en la parte final de realización de esta tesis.

A todos mis compañeros del grupo de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, por su amistad sincera, los momentos compartidos y su contribución invaluable en la elaboración de este trabajo.

Gracias a todos aquellos que hicieron posible esta tesis.

Resumen

Teniendo en cuenta la importancia del Caballo Criollo Colombiano, tanto a nivel nacional como internacional y con el fin de aportar a una completa caracterización citogenética de este, se realizó una evaluación cromosómica mediante diferentes técnicas de bandeo, en animales representantes de los diferentes andares y otros tomados a manera de grupos genéticos foráneos, confirmando para todos ellos un número cromosómico $2n=64$ y encontrando polimorfismos y algunas expresiones diferenciales de bandas entre las dos poblaciones, lo que permite proponer un modelo cariológico e idiograma para nuestro caballo criollo, siendo el primer reporte para la literatura.

Palabras clave: Cariotipo, Idiograma, Biodiversidad, Bando cromosómico, Polimorfismo

Abstract

Considering the importance of Colombian Autochthonous Horse, nationally as well as internationally, and aiming to provide a complete cytogenetic characterization of it, we performed a chromosomal evaluation using different chromosome banding techniques in representative animals of a different gaits and others considering them as two foreign genetic groups. We confirm for all individuals a chromosome number $2n = 64$, but we find polymorphisms and differential expression of some chromosomal bands between both populations. Therefore these results allow us to propose a karyological and ideogram model for our autochthonous horse reported here for the first time.

Keywords: Karyotype, Idiogram Biodiversity, Chromosome banding, Polymorphism

Contenido

	Pág.
RESUMEN	IX
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABLAS	XV
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XVI
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEORICO	3
1.1 Caracterización citogenética y molecular	5
1.1.1 Bandeos cromosómicos	6
1.1.2 Estudios citogenéticos en equinos	8
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1 Población de estudio.....	11
2.2 Cultivo.....	12
2.3 Cosecha	12
2.4 Fijación	12
2.5 Goteo.....	12
2.6 Técnicas de identificación y coloración	13
2.6.1 Coloraciones diferenciales	13
2.6.2 Coloraciones selectivas.....	13
2.6.3 Coloración molecular mediante enzimas de restricción	14
3. RESULTADOS	16
3.1 Cronología de la duplicación del genoma	18
3.2 Bandas R-replicativas	23
3.3 Bandas G.....	26
3.4 Bandas C-G.....	28
3.5 Bandas de restricción	28
3.6 Bandas C.....	32
3.7 Bandas NOR.....	34
3.8 Polimorfismos	39
4. DISCUSION	41
5. CONCLUSIONES	47
ANEXO 1	49
BIBLIOGRAFÍA	50

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Pulso terminal de BrdU en el ciclo celular.	7
Figura 3-1: Cariotipo e Idiograma del Caballo Criollo Colombiano con tinción homogénea.....	17
Figura 3-2: Extendidos cromosómicos de linfocitos de CCC en los diferentes estadios replicativos encontrados.....	19
Figura 3-3: Idiogramas de los estadios replicativos de linfocitos de CCC.....	20
Figura 3-4: Gráfica cronología en la duplicación del genoma.....	21
Figura 3-5: Estadios replicativos (EI, EII, EIII, EIV, EV, EVI) para cromosoma X CCC.....	21
Figura 3-6: Estadios encontrados para el cromosoma X según el pulso terminal de BrdU.....	22
Figura 3-7: Extendidos cromosómicos de CCC con bandas R-replicativas.....	23
Figura 3-8: Cariotipo e Idiograma bandas R-replicativas CCC.	25
Figura 3-9: Extendidos cromosómicos de CCC con bandas G.....	26
Figura 3-10: Cariotipo e Idiograma CCC con bandas G.....	27
Figura 3-11: Extendidos cromosómicos de CCC con bandas C-G.....	28
Figura 3-12: Extendidos cromosómicos de CCC con bandas de restricción.....	29
Figura 3-13: Cariotipo e Idiograma CCC con bandas de restricción enzima BSP 120I.....	30
Figura 3-14: Cariotipo e Idiograma CCC con bandas de restricción enzima Dra I	31
Figura 3-15: Extendidos cromosómicos de CCC con bandas C	32

Figura 3-16: Cariotipo e Idiograma CCC con bandas C.....	33
Figura 3-17: Extendidos cromosómicos de CCC y CA con bandas NOR.....	35
Figura 3-18: Polimorfismos NOR en cromosoma 1.....	36
Figura 3-19: Asociaciones cromosómicas de las regiones organizadoras del nucléolo...36	
Figura 3-20: Cariotipo e Idiograma CCC con bandas NOR.....	37
Figura 3-21: Gráfica de frecuencia cromosómica NOR en CCC.....	38
Figura 3-22: Extendidos con tinción homogénea: Cromosomas polimórficos CCC y CA.....	39

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Individuos muestreados.....	11
Tabla 3 1: Distribución (porcentaje) de estadios en diferentes tiempos de exposición a BrdU.....	20
Tabla 3-2: Expresiones diferenciales de regiones cromosómicas en CCC y CA.....	24
Tabla 3-3: Frecuencia de bandas NOR en cromosomas equinos.....	34
Tabla 3-4: Prueba de variabilidad bandas NOR en CCC y CA.....	38
Tabla 3-5: Cromosomas polimórficos CCC con diferentes bandeos.....	40

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
CA	Caballo Árabe
CCC	Caballo Criollo Colombiano
PSI	Pura Sangre Inglés
NOR	Regiones Organizadoras del Nucléolo
Ag-NOR	Regiones Organizadoras del Nucléolo teñidas con plata
BrdU	5'-2- Bromodeoxiuridina
T	Timina
μl	Microlitros
ml	Militros

Introducción

En la historia de la humanidad, el caballo ha sido durante miles de años su acompañante y colaborador, con él, dominó la caza, efectuó conquistas y acortó distancias y además le sirvió de compañía y recreación.

En los tiempos modernos, el cambio cultural hacia el esparcimiento y el ocio recreativo ha permitido que la industria equina avance. De ahí que existen equinos de competencia, de salto, de exhibición, entre otros por tal razón, se encuentran varios morfotipos de esta especie en el mundo, algunos, de origen muy antiguo como el Árabe, Caspio y Andaluz y otros con historias más recientes como el Criollo Colombiano, cuyo origen, es consecuencia de la llegada al nuevo mundo, de ejemplares descendientes de caballos originarios de España.

En nuestro país neotropical, con diversidad geográfica, desde la llegada del caballo, ha existido un estrecho vínculo con el hombre, lo cual ha generado un aprecio especial por los equinos, reflejado en un gran número de ejemplares, altas inversiones en la compra de los ejemplares e incremento en la demanda por servicios técnicos especializados.

El Caballo Criollo Colombiano es reconocido por su elasticidad, suavidad, ritmo y armonía de movimientos, además de su temperamento y brío característico, favorable para el aprendizaje. Un gran número de personas dedican su vida a la crianza de estos animales prestando especial interés a su reproducción, nutrición y sanidad para obtener ejemplares que cumplan con los estándares comerciales.

A pesar que Colombia ha sido históricamente un país con vocación en la producción equina, su crianza se ha enfocado en aspectos relacionados con el mejoramiento de los esquemas sanitarios preventivos y de diagnóstico. Se han realizado estudios en reproducción asistida, nutrición con pastos mejorados y suplementos alimenticios balanceados pero, en el campo de la genética los estudios realizados con el Caballo Criollo son pocos, por lo cual hacen falta ampliar este campo que contribuya al conocimiento del Caballo Criollo Colombiano con miras a generar programas de mejoramiento en su desempeño y contribuir a su conservación como acervo genético único. Se estima que la selección exclusivamente fenotípica (Jiménez, 1996) empleada en la elección de reproductores, causa pérdidas económicas hasta del 72.2% (McFeely 1990).

Teniendo en cuenta lo anterior, y con el fin de contribuir al conocimiento de la genética del Caballo Criollo Colombiano, en este trabajo se elaboró el primer

cariotipo de la especie mediante diferentes técnicas de bandeo cromosómico (G, R-replicativo y C), NOR y enzimas de restricción y se realizó un análisis de polimorfismos buscando una similitud con la especie o dando las primeras luces sobre su clasificación como grupo genético.

1. MARCO TEORICO

El Caballo Criollo Colombiano pertenece a la clasificación taxonómica del caballo doméstico conocido en todo el mundo, la cual se puede describir así: Clase: Mammalia, Orden: Perissodactyla, Familia: Equidae, Género: Equus, por lo cual su Nombre científico: Equus caballus

La historia del caballo va de la mano de la historia del hombre, en el proceso de la evolución cultural. Se presume que el Equus se originó en Norte América, luego migró a Europa, Asia y África, pero desapareció del continente americano hace aproximadamente 10.000 años (Silver, 2000). Actualmente, el género Equus agrupa tres subgéneros: Equus, el de los caballos; Asinus, el de los asnos y el Hippotigris, al cual pertenecen las cebras (Groves & Ryder, 2000).

De acuerdo a la definición de la FAO, una raza es un grupo de animales con características externas definidas que permiten separarlos de grupos de la misma especie mediante una evaluación visual y las razas autóctonas, se definen como las procedentes de una región geográfica particular, adaptada y utilizada en ella, con alto valor económico, debido a su gran adaptación, rusticidad y resistencia a plagas y enfermedades, constituyendo una base genética muy fuerte dentro de cada región (Infante, 2008).

En todo el mundo, existen 753 razas equinas del total de 5300 razas de animales domésticos. Los caballos, se agrupan según el temperamento en animales de “sangre fría” como el percherón, el frisón, y el clydesdale entre otros, originarios de Europa Central (Hermsen 1997) con carácter tranquilo, pesados y resistentes al frío, generalmente empleados para tiro. Por otro lado, los animales de “sangre caliente” son caballos inquietos y nerviosos, entre los cuales se encuentran los árabes, pura raza española (PRE) y pura sangre inglés (PSI).

Los caballos ingresaron al continente americano en el segundo viaje de Cristóbal Colón en 1493, caballos berberiscos, árabes y andaluces y desembarcaron en la isla “La Española” conocida hoy como República Dominicana. El cruce y selección de estas razas en Sur América, dio origen a lo que hoy conocemos como Caballo Criollo, el cual luego de 400 años de evolución y adaptación ha adquirido características propias e importantes según las regiones que habitan

(Hermsen 1997). Así, se destacan los caballos criollos de Argentina, Chile, Brasil, Venezuela, Uruguay, Perú y Colombia.

Los caballos llegan a Colombia en el año 1524 (Bravo 2001) con Rodrigo de Bastidas y después de muchos años de adaptación y selección se originó el Caballo Criollo Colombiano (CCC) adaptado a nuestro medio, el cual ha desarrollado distintos andares según las características topográficas de la zona que habita. Por ejemplo, los que crecían en el pantanoso altiplano cundiboyacense, el andar en las manos, el “pincheleo” y un casco ancho, les facilitaban su sobrevivencia en terrenos cenagosos. Los caballos que habitaban Antioquia que caminaban entre trochas y montañas, desarrollaron el andar “pistoneo” destacándose por su elasticidad y potencia. Hacia los años 50, estos caballos criollos se cruzaron entre ellos, originando un ejemplar más llamativo, trochador y con andar de pistoneo (Jiménez et al, 2005), que son los antecesores de los cuatro andares característicos del caballo criollo colombiano actual.

Colombia, es un país con alta población equina para diversas actividades. La encuesta nacional agropecuaria de 2009 (ENA 2009) estimó una población equina de 3.159.403 individuos, de los cuales 2.505.579 son caballos, 220.847 son asnos y 432.977 son mulas (ver anexo 1). Actualmente, el Caballo Criollo Colombiano se considera uno de los recursos genéticos más valiosos del país, gracias a sus cualidades fenotípicas y a su desempeño deportivo, siendo una de las especies de mayor importancia productiva y a su comercialización a nivel nacional e internacional (Jiménez et al, 2005) ocupando un importante renglón de la economía.

El uso del caballo, genera empleo, moviliza diversos sectores económicos, desde la artesanía hasta la industria alimenticia y farmacéutica. Muchas personas dedican su vida a la crianza del Caballo Criollo Colombiano prestando especial interés a la obtención de los mejores ejemplares, que cumplan con los estándares comerciales y por ser poseedor de un valor especial en la diversidad nacional y global. No obstante esta importancia, son pocos los estudios sobre el acervo genético y la conservación de la pureza de estos animales criollos, además los programas de mejoramiento genético, se basan principalmente en su conformación física, su desempeño en pistas y sus antepasados (Jiménez et al 1996), por tanto, no hay claridad al momento de seleccionar los reproductores.

Lo anterior, hace que exista una controversia en cuanto a si el Caballo Criollo Colombiano es o no una raza o un grupo genético, ya que al cruzar animales de razas puras como Árabe, Andaluz y Pura Sangre Inglés (PSI), se producen hijos con características similares heredadas de sus padres, mientras que el cruce entre los caballos criollos colombianos, generan descendientes con gran

variabilidad en la conformación y alzada y además los hijos, no siempre heredan el paso de los padres (Bravo 2001).

El caballo criollo colombiano ostenta una alzada promedio de 1.50 m, contextura y extremidades finas, cuello breve y vigoroso, orejas pequeñas en punta y colores varios (Betancur, 2006). Su principal característica es la de poseer cuatro modalidades de andar: paso fino, trocha, trote y galope y en cada una de ellas la capacidad de ejecutarlas con suavidad, velocidad, armonía, sostenimiento y sonoridad, acompañados de un despliegue de fuerza, belleza, brío y temperamento (Betancur, 2006).

1.1 Caracterización citogenética y molecular

Para el análisis citogenético, es necesario la realización de un cultivo celular a partir del cual se obtienen los cromosomas. En mamíferos, generalmente se emplean linfocitos de sangre periférica dada la facilidad de obtención y procesamiento de la muestra (López et al, 2002).

Los linfocitos son las principales células leucocitarias no granuladas del sistema inmunológico (Trigo, 1993) de los cuales, se estima una proporción de 31% respecto al total de leucocitos en sangre periférica de mamíferos con un período de vida de hasta 1500 días (Moreno et al, 2008). En equinos, los linfocitos T constituyen entre 60 y 80% de los linfocitos circulantes en sangre periférica (McGuire et al, 1974; Curotto et al, 2009). La respuesta de los linfocitos T sólo ocurre ante la presencia de antígenos proteicos unidos a proteínas de superficie de otras células, los cuales forman un complejo con la membrana de los macrófagos y monocitos que lo fagocitaron y con las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, conocido como ELA (Equine Leucocyte Antigen) (Tizard, 1992.)

Varias investigaciones han demostrado que las células linfoides, pueden ser estimuladas in vitro para su proliferación al exponerse a un antígeno específico (Oppenheim, 1968; López et al, 2002) lo que también puede lograrse a través de estimulantes inmunológicos como la fitohemaglutinina o la antiglobulina. (Phillips et al, 1970). La fitohemaglutinina es una lectina extraída del frijol *Phaesolus vulgaris* que funciona como inductor de ciclos celulares en linfocitos T, útil en la obtención de cromosomas a partir de sangre periférica.

Este proceso, además requiere el uso de sustancias antimitóticas como la colchicina o el colcemid, generalmente usadas como medicamentos en el tratamiento de neoplasias, para la obtención de extendidos cromosómicos de alta calidad (López et al, 2002).

1.1.1 Bandoes cromosómicos

El ADN y las proteínas asociadas (histónicas y no histónicas) conforman la cromatina (Rieger, et al 1976), la cual puede presentar diferentes grados de condensación dependiendo de la fase celular en la cual se encuentren las células. En la fase mitótica, la eucromatina son regiones poco condensadas, de replicación temprana y transcripcionalmente activas y la heterocromatina, son altamente condensadas, de replicación tardía e inactiva (Rodríguez, 2009). La heterocromatina puede ser de dos tipos: Facultativa, es eucromatina que se inactiva y se convierte en heterocromatina como el caso de uno de los cromosomas X en las hembras de mamíferos y Constitutiva, formada por secuencias repetidas de ADN que se encuentran altamente condensadas (Rodríguez, 2009).

En la mayoría de las especies, la heterocromatina constitutiva se ubica de forma similar en todos los cromosomas del genoma en los telómeros y centrómeros y tiñe más oscuro durante la interfase y profase que la eucromatina. La cantidad y distribución de las secuencias heterocromáticas dentro de los individuos de una misma especie o filogenéticamente relacionados podrían usarse como herramienta en el estudio de procesos de especiación (García, 2001).

A través de varias generaciones, se pueden observar cambios cromosómicos relacionados con variaciones numéricas o estructurales como inversiones, traslocaciones, activaciones e inactivaciones centroméricas, fusiones y fisiones, (López et al, 2002) los cuales también estarían implicados en los procesos de especiación (García, 2001).

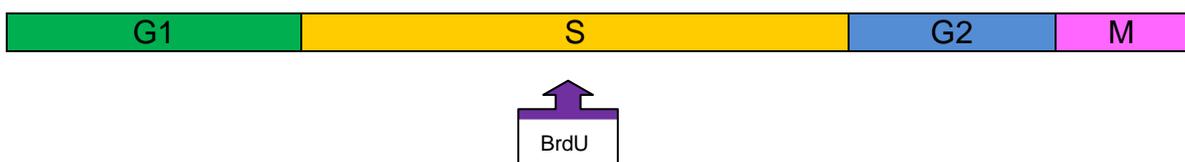
La visualización de la cromatina se estableció, de acuerdo a tinciones específicas, localizadas en cada par cromosómico, denominadas como bandedo, herramienta fundamental en los estudios cariotípicos (Lacadena, 1996). Actualmente, algunas técnicas citogenéticas son empleadas con el fin de realizar análisis cualitativo de la heterocromatina, tales como la tinción cromosómica para bandas C y la digestión con enzimas de restricción, relacionados con aspectos evolutivos entre especies. (Bella et al, 1995).

Actualmente, las técnicas de bandedo han contribuido no solo a incrementar la posibilidad de determinar alteraciones genéticas que conducen a enfermedades que comprometen la salud, la producción y el desempeño reproductivo de los animales; también contribuyen a la diferenciación entre especies, razas e incluso entre individuos pertenecientes a la misma raza, no sólo por el número y morfología de los cromosomas, sino también por los patrones de bandas (Egozcue et al, 1973).

Las técnicas de bandeo se clasifican de acuerdo a si producen bandas a lo largo de cada uno de los cromosomas conocidas como diferenciales o selectivas, si sólo colorean sitios específicos del cromosoma. Las **bandas G** y **R** son importantes en los análisis cariológicos de la mayoría de los animales de interés zootécnico, permite la identificación de los cromosomas homólogos. En las coloraciones selectivas, se destacan las **bandas C** y **NOR** que facilitan la identificación cromosómica y los estudios de polimorfismos. (Puentes, 2000). Las primeras, localizan la heterocromatina constitutiva y las últimas, revelan las regiones activas del genoma donde se localizan los genes que codifican el RNA ribosomal (rRNA) (López et al, 2002), usando el método de tinción con plata (Goodpasture et al, 1975; Miller et al 1976; Arruga, 1989). Estas áreas negras sobre los brazos de los cromosomas (Puentes, 2000) permiten establecer polimorfismos fisiológicos, consistentes con la expresión de regiones implicadas en la síntesis de rRNA.

El **bandeo R-replicativo**, es una coloración diferencial realizada mediante el uso de pulsos terminales de un análogo de la timidina, el 5-Bromo2'-deoxiuridina (BrdUrd) (Camargo y Cervenka, 1980). Mediante esta técnica, la fase S se subdivide en seis estadios replicativos y se establece que el estadio III de replicación genera un patrón de **bandas R-replicativas** que corresponde al reverso de las **bandas G**. El tiempo de aplicación de BrdU, varía según la duración del ciclo celular y espera marcar las células que estén pasando por la fase S desde su adición. Durante esta fase, la cadena de DNA en replicación, incorpora BrdU en los sitios correspondientes a la Timina (T), ya que su concentración en el medio de cultivo es mucho mayor que la de la base nitrogenada producida por la célula (López et al, 2002). El resultado es un patrón de bandas R oscuras, las cuales son regiones ricas en Citocina-Guanina (C-G) y de duplicación temprana y las R claras, formadas por regiones A-T de replicación tardía.

Figura 1-1 Pulso terminal de BrdU en el ciclo celular



Esta técnica permite reconocer el comportamiento replicativo de la cromatina dependiendo del momento en el que se realiza el pulso terminal de BrdU y ha sido útil en la caracterización de especies en Colombia tales como la guagua Agouti paca (López et al, 1997), el búfalo *Bubalus bubalis* (Alzate et al, 2001), el

Pecarí de collar *Tayassu tajacu* (Builes et al, 2004) y la guagua de cola *Dynomis branickii* (Ureña et al, 2010), entre otros.

Las **Bandas de restricción** requieren enzimas que reconocen y degradan una secuencia nucleotídica, fragmentando la doble cadena del DNA en secuencias específicas (Babu, 1988). De estas enzimas se conocen tres tipos según corten el DNA en fragmentos de mayor o menor número de bases así, tipo I: las cortan el DNA mayor a 1000 pares de bases de un punto de reconocimiento asimétrico. Tipo II: las que reconocen y cortan secuencias de DNA entre 4 y 6 pares de bases y las tipo III: reconocen el DNA en secuencias asimétricas de 5 a 7 pares de bases y degradan la secuencia localizada 24-26 pares de bases más adelante (Lewin, 1985). La utilización de estas enzimas, permite analizar regiones del cromosoma con alto contenido de DNA satélite y secuencias metiladas (Bird, 1987) y es muy útil en el estudio de polimorfismos cromosómicos. Su uso se ha reportado en cromosomas de almejas (Martínez-lage et al 1996), primates (García, 2001), bovinos (Genero 2001), cerdos (Adega et al, 2005) y ostras (Leitão et al, 2007).

1.1.2 Estudios citogenéticos en equinos

Kirillow en 1912 estudió por primera vez los equinos desde el punto de vista citogenético (Power, 1990), luego se determinó el cariotipo del caballo doméstico $2n = 64$, de los cuales 13 pares de autosomas son metacéntricos o submetacéntricos y los 18 pares restantes son acrocéntricos (Richer et al, 1990). El cromosoma X es un submetacéntrico grande y el cromosoma sexual Y es similar en tamaño al autosoma más pequeño (Ronne et al, 1993).

El sistema de nomenclatura cromosómica en equinos basados en estudios de bandeo Q, G, C, R y NOR (Bowling et al, 1997) fue actualizado bajo el nombre de Sistema Internacional para la Nomenclatura Citogenética del Caballo Doméstico (ISCNH) en 1997 (Bowling et al, 1997). Estas publicaciones, han reportado algunas anomalías en autosomas equinos, como trisomías en los cromosomas 23, 26, 28, 30 y 31 (Bowling & Millon, 1990; Klunder et al, 1989; Power, 1987, 1991; Lear, 2009); no obstante más del 90% de las anomalías cromosómicas reportadas en caballo doméstico involucran los cromosomas sexuales, dentro de estos se presenta con mayor frecuencia el síndrome del X0 (Power, 1990); las yeguas portadoras de esta anomalía son normalmente pequeñas e infértiles, sus extremidades traseras son muy anguladas y presentan hipoplasia ovárica combinada con hiperplasia del clítoris (Breen et al, 1997).

Por otro lado, se han reportado individuos con síndrome de reversión sexual (Bowling et al, 1987; Bugno et al, 2003) de los cuales se conocen dos tipos: los

que tienen fenotipo de hembra y cariotipo de macho (64, XY) y los que presentan fenotipo de macho y cariotipo de hembra (64, XX) siendo más común el primer tipo 64, XY. Así mismo se han reportado yeguas con mosaicismos en el complemento cromosómico 63, X / 64, XX (Long, 1989; McFeely, 1990; Moncaleano et al, 2007) el cual afecta el desarrollo del tracto reproductivo, observándose ovarios muy pequeños y/o quísticos, cuerpos lúteos persistentes, atrofia endometrial y/o flacidez cervical; lo que conlleva a ciclos irregulares, anovulatorios o anestros prolongados (MacFeely, 1990) sin un patrón fenotípico específico.

También se han reportado cariotipos 65, XXX (Bowling et al, 1987) y 65, XXY; este último asociado a hipoplasia testicular y criptorquidia. Recientemente se encontró en un primer estudio, que una pequeña delección en el brazo corto del cromosoma 1 podría ser la causante de una malformación conocida como hipospadias en equinos (De Lorenzi et al, 2010). Estas anomalías cromosómicas al parecer son más frecuentes en algunas razas de caballos, como ocurre con el síndrome de reversión sexual muy frecuente en caballos árabes (Bugno et al, 2003).

En Brasil (2005) se realizó un estudio citogenético en asnos *Equus asinus* raza brasilera marchadora para cariotipar la raza e identificar los polimorfismos presentes. Los resultados obtenidos, difirieron de lo reportado en la literatura para esta especie, lo cual podría ser característico de la ubicación geográfica y útiles como marcadores poblacionales (Pereira et al, 2005). Estudios previos de bandas NOR en caballos (Cribru, 1981) y asnos (Kopp et al, 1983) demostraron una rápida evolución del cariotipo del género *Equus* ya que no se encontró homología de bandas entre los cromosomas correspondientes. También se encontraron diferencias en bandeo NOR en cromosomas de equinos raza Mangalarga respecto a lo reportado en otros estudios para la especie (Lui et al, 1990).

En Colombia, se han realizado estudios citogenéticos en caballos para determinar anomalías cromosómicas. Jiménez (1997) realizó análisis de cromosomas equinos Colombianos PSI encontrando que el 22.7% de los animales muestreados eran portadores de algún tipo de anomalía cromosómica (64, XX/63, X ó 64, XY/63, X). Henao (2002) reporta un estudio citogenético a una yegua mestiza estéril con mosaicismos en el complemento cromosómico 63, X /64, XX con 46% de células anormales y 54% de células 64, XX. Este ejemplar tenía fenotipo y genitales externos normales, pero el análisis ecográfico mostró útero y ovarios pequeños y activos. En otro estudio, se encontró también mosaicismos (64, XX/ 63, X) en cuatro yeguas, tres de ellas Criollas Colombianas, con porcentaje de células anormales entre 25% y 63% Este complemento

cromosómico estuvo asociado a infertilidad, teniendo en cuenta que aunque fenotípicamente estas yeguas eran normales, presentaban un historial reproductivo de abortos y producción de crías inmaduras o con malformaciones que morían o debían ser sacrificadas (Moncaleano et al, 2007).

Los anteriores reportes muestran que la citogenética ha sido útil en diagnósticos en reproducción animal y en la comprensión de algunos tipos de infertilidad, muertes embrionarias y fetales, desarrollos somáticos o sexuales anormales y determinación prenatal del sexo (Hare y Singh 1979), no obstante, la técnica no ha sido muy empleada en la caracterización de razas equinas. Los estudios genéticos realizados para esta especie se han enfocado principalmente en variabilidad por microsatélites (Kelly et al, 2002; Jiménez et al, 2007; Hofneinz, 2007) y morfología (Infante, 2008).

La elaboración de cariotipos mediante diferentes técnicas de bandeo y su respectivo análisis permite descartar como reproductores a aquellos individuos portadores de anomalías cromosómicas que puedan presentar problemas de fertilidad o desempeño (Jiménez et al 1996) favoreciendo al establecimiento de un plan de conservación y mejoramiento genético de este grupo poblacional. De igual manera la citogenética actual está encaminada a determinar la pureza de la raza mediante la detección y reconocimiento de polimorfismos específicos de la población que acompañada de la evaluación del patrón de duplicación del genoma permite la caracterización de la raza como tal (López et al, 2002).

Las anteriores observaciones y reportes, justifican la realización de este estudio, con miras a obtener un análisis cromosómico detallado y específico para el Caballo Criollo Colombiano, con el fin de contar con información básica que permita la caracterización citogenética de la raza y además facilite la selección de los animales reproductores con criterios citogenéticos y promueva su conservación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Población de estudio

Para el estudio se partió de la información disponible en relación a linajes de una población inicial amplia de la cual se seleccionaron diez individuos de pesebrera, cinco machos y cinco hembras de raza criolla colombiana (CCC), adultos en edad reproductiva y representantes de los diferentes andares. Con el fin de realizar una comparación genéticamente contrastante se muestrean dos individuos (un macho y una hembra) árabes (CA) teniendo en cuenta que esta raza es uno de los antepasados más lejanos del CCC.

Las muestras fueron tomadas en el criadero **Nuevo Mundo** en el municipio de Medellín y en la **Clínica Veterinaria San Luis** en el municipio de La Estrella. La venopunción se realizó en la vena yugular previa desinfección del área, con sistema vacutainer individual y tubos con heparina, acto seguido se llevó la muestra al Laboratorio **Genera_{EU}** para la realización de los cultivos.

Tabla 2-1 Individuos muestreados

INDIVIDUO	SEXO	ANDAR
1	Macho	Trocha
2	Macho	Trote y Galope
3	Macho	Trocha
4	Macho	Trocha
5	Macho	Paso Fino
6	Hembra	Trocha
7	Hembra	Paso Fino
8	Hembra	Trocha
9	Hembra	Trocha
10	Hembra	Paso Fino

2.2 Cultivo

Cada cultivo se realizó en condiciones asépticas con 500 µl de sangre periférica en 4 ml de medio RPMI 1640, suplementado al 5% SFB, 50 µl de solución de penicilina + estreptomina, 50 µl de fitohemaglutinina (PHA), 1% heparina y se incubaron a 37°C durante 66 - 72 horas. Entre 5 – 7 horas antes de la cosecha se agregaron 50 µl de BrdU (1 mg/ml) sólo a los cultivos para la realización de bandeos R replicativo y entre 1- 10 horas para la evaluación de la cronología en la duplicación del genoma, una hora antes de finalizar el tiempo de incubación se adicionó el colcemid a cada cultivo.

2.3 Cosecha

Al cumplirse las horas de incubación, los cultivos en suspensión fueron transferidos a tubos cónicos y centrifugados a 900 x g durante 10 minutos, luego de descartado el sobrenadante y de resuspender el botón celular y se agregó la solución hipotónica (KCL 0.075 M) y se incubaron 10 minutos a 37°C luego se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones.

2.4 Fijación

Se agregó gota a gota fijador fresco a los tubos cónicos preparado con metanol y ácido acético en proporción 3:1, al mismo tiempo estos fueron agitados enérgica y rápidamente; luego se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente para después por centrifugaciones sucesivas hacer lavados, resuspendiendo el botón celular en fijador que al final tendrá un volumen de 0.5 ml para realizar el goteo.

2.5 Goteo

Sobre portaobjetos previamente mantenidos en hielo húmedo se goteó a una altura de 45 a 55 cm una fracción de la suspensión obtenida pre-goteados con fijador y posteriormente flameados

Estas placas fueron revisadas en microscopio con el fin de evaluar el grado de dilución y de esparcimiento y posteriormente almacenadas hasta el momento de la coloración según la técnica a emplear.

2.6 Técnicas de identificación y coloración

2.6.1 Coloraciones diferenciales

Para la identificación de los cromosomas homólogos y sexuales y para la evaluación de la cronología en la duplicación del genoma, se aplicó el método pertinente para la obtención de **bandas R-replicativas** mediante la incorporación en medio de **BrdU**, descrito por Camargo & Cervenka (1982), así las láminas envejecidas fueron sumergidas en solución bis BENZIDIMIDE (Hoechst 33258) 0.3g/ml durante 10 minutos. Luego, lavadas con agua destilada y secadas suavemente para remover el exceso de agua. Cada lámina, en posición horizontal, se impregnó homogéneamente con 2xSSC y se cubrieron con laminillas. Fueron expuestas a iluminación con una lámpara Sylvania Capsylite 75w, 120w PAR 30, durante 60 minutos. Pasado este tiempo, fueron coloreados con Giemsa al 5%. Con el fin de determinar el número cromosómico y la clasificación de los cromosomas se realizó la **coloración homogénea**, para lo cual fue necesario cubrir las placas con los extendidos con una solución de Giemsa al 5% entre 5 - 8 minutos. Posteriormente se llevó a cabo la Coloración para **bandas cromosómicas G** también para identificar cromosomas homólogos, modificando el protocolo propuesto por Seabright (1971), esto se logró sometiendo las láminas envejecidas de 6 ó 7 días en una solución de tripsina al 0.05%, durante 5 minutos; se lavaron con solución salina y se colorearon con Giemsa al 4% durante 3 minutos. Con miras a evaluar algunos polimorfismos se realizó la coloración para **bandas cromosómicas C-G** agregando solución Leishman con el buffer tampón Leishman en una proporción 1:4 a las placas recién goteadas, se dejó actuar durante 5 minutos y se lavaron con agua destilada.

2.6.2 Coloraciones selectivas

Para la detección de la heterocromatina y polimorfismos las láminas fueron sometidas a 2xSSC a 70°C por 60 minutos; al finalizar fueron lavadas con agua destilada y coloreadas con Giemsa al 4% entre 2 y 4 minutos, obteniéndose así **bandas C**. Con el fin de detectar las **NOR** activas se aplicó el protocolo propuesto por Hillis (modificado) en 1996, así las preparaciones se cubrieron con 0.3 ml de una solución con 0.25 mg de AgNO₃ y 0.25 de otra solución con gelatina al 2% y ácido fórmico al 1%, se incubaron a 90°C durante 90 segundos, se lavaron, se dejaron secar al aire y se les hizo tinción con Giemsa 2% durante 1 minuto.

2.6.3 Coloración molecular mediante enzimas de restricción

Basados en el protocolo propuesto por García (2001), las láminas recién goteadas (se necesita control de la digestión y control del tampón) fueron sometidas a deshidratación en incubadora una hora; poco antes de terminar la hora se diluyó el tampón concentrado (10X) en agua desionizada hasta una concentración de 1X. Pasada la hora fue disuelta la enzima (Dra I o BSP 120I) con su solución tampón (portaobjetos digestión y control). Se depositaron 50 µl de la solución formada por el tampón sobre la lámina (control del tampón) con un cubreobjetos encima de cada preparación vigilando que no quedaran burbujas de aire. La misma cantidad de la solución formada por la enzima de restricción y el tampón se adicionó a las láminas “Blanco” y control de la digestión y cubiertas por un cubreobjetos. Los portas fueron introducidos en cámara húmeda y se dejaron incubar toda la noche a 37°C; al siguiente día se eliminaron los cubreobjetos mediante inmersión en agua destilada y una vez secas las muestras (secado al aire) se colorearon con Giemsa durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo se lavaron con agua y se secaron

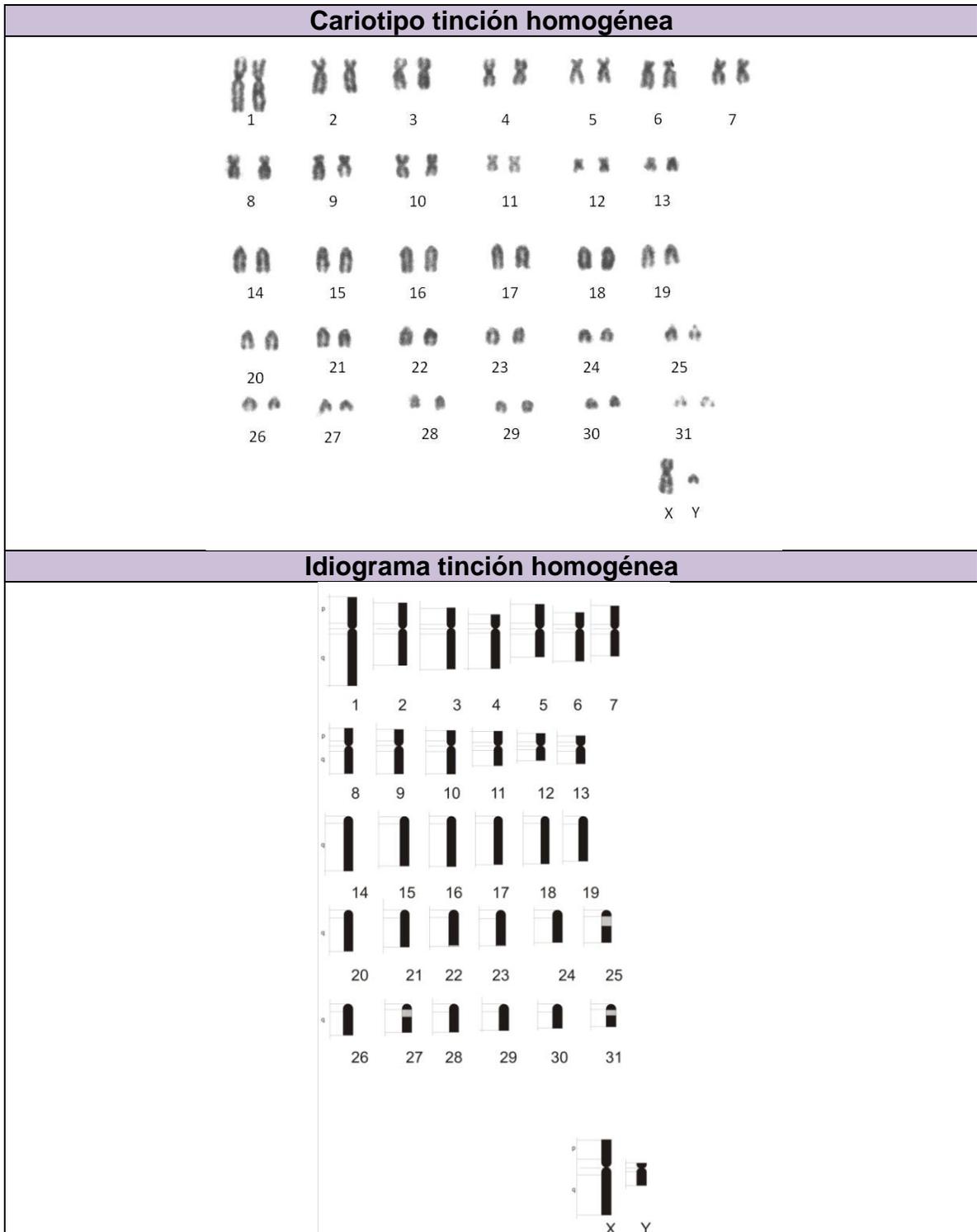
Para conservar los extendidos cromosómicos de todos los tipos de bandas realizadas, los portaobjetos fueron cubiertos con entellan, protegidos con cubreobjetos. Todas las láminas fueron sometidas a observación microscópica. Se evaluaron **30 mitosis** por muestra con el fin de determinar el número cromosómico. Luego se seleccionaran mitosis representativas de cada modalidad (tinción homogénea, Bandas G, Bandas R replicativas, Bandas C, Bandas C-G, NOR y bandas de restricción) para elaborar los respectivos cariotipos e idiogramas. Los cromosomas fueron ordenados y medidos mediante el programa COREL DRAW X3, calculando la longitud total, longitud de cada brazo y longitud de las bandas para cada cromosoma, con lo que se calcula la longitud relativa, índice centromérico, índice braquial para la clasificación de los cromosomas. Los idiogramas se elaboraron usando el programa COREL DRAW X3.

Finalmente se realizó la comparación de las características encontradas entre individuos, teniendo en cuenta homologías y diferencias, los datos cuantificables fueron procesados de forma paramétrica y no paramétrica bajo el programa estadístico SAS versión 9.2.

3. RESULTADOS

Se realizaron los cariotipos de los 12 ejemplares: 2 Árabes, un macho y una hembra y 10 Criollos Colombianos, cinco machos y cinco hembras de genealogías separadas entre sí, en los que se confirmó el número cromosómico para el caballo domestico $2n=64$, 13 pares metacéntricos o submetacéntricos y 18 acrocéntricos, siendo el cromosoma X el segundo submetacéntrico más grande y el Y uno de los acrocéntricos más pequeños (no el más pequeño). Posteriormente se analizaron los patrones de bandeo para Caballo Criollo Colombiano, con el fin de determinar diferencias y polimorfismos, finalmente se construye el idiograma. Los resultados se presentan a continuación.

Figura 3-1 Cariotipo e idiograma del Caballo Criollo Colombiano con tinción homogénea



3.1 Cronología de la duplicación del genoma

En este trabajo se estimó el patrón de duplicación del genoma en linfocitos de sangre periférica de Caballo Criollo Colombiano mediante la incorporación de BrdU, para lo cual se evaluaron cuatro tiempos de incorporación antes de la cosecha del cultivo: 10, 7, 4 y 1 horas. Se encontraron seis diferentes estadios teniendo en cuenta los parámetros de López (1992) en linfocitos humanos de sangre periférica.

Los estadios obtenidos se describen a continuación: (ver figura 3-2)

Estadio I: Aquellas células que han incorporado BrdU durante toda la fase S de replicación, los cromosomas son generalmente pálidos, en algunas ocasiones se presentan puntos oscuros en la región centromérica pero de menor tamaño que las bandas C.

Estadio II: Corresponde a aquellas células que se encontraban en el inicio de la fase S al momento de la incorporación del BrdU, por lo tanto apenas se empiezan a presentar bandas equivalentes a regiones eucromaticas de replicación más temprana, consideradas como un bandeo R-replicativo incompleto.

Estadio III: Se presentan clara y totalmente las bandas R-replicativas, ya que las células incorporan BrdU en la mitad de la fase S. Este patrón de bandas es muy útil en la identificación del cromosoma X inactivo y otros sectores del cromosomas que controlan la expresión génica y se duplican tardíamente, (heterocromatina facultativa) el patrón de bandeo de este estadio es reverso al de las bandas G.

Estadio IV: Los cromosomas conservan el patrón de bandas R-replicativas, con bloques oscuros mucho mayores.

Estadio V: Corresponde a aquellas células que se encuentran en el último tercio de la fase S en la cual se replica la última parte del genoma, equivalentes a regiones heterocromaticas ricas en A-T.

Estadio VI: Los cromosomas en toda su longitud presentan una coloración oscura completamente homogénea, reflejando que las células no incorporaron BrdU ya que habían superado la fase S y estaban en fase G2.

En la **figura 3-2**, se presentan las metafases de los 6 estadios encontrados, y se representa esquemáticamente en la **figura 3-3**; La proporción de metafases encontradas en cada uno de los diferentes estadios según el tiempo de incorporación del BrdU se muestra en la **tabla 3-1** y su respectiva gráfica en la **figura 3-4**. Posteriormente se muestran el idiograma para el cromosoma X del Caballo Criollo Colombiano en los 6 diferentes estadios (**Figura 3-5**). Por último, se hace una representación grafica (**Figura 3-6**) de los estadios más frecuentes según el tiempo del pulso terminal de BrdU.

Figura 3-2. Extendidos cromosómicos de linfocitos de CCC en los diferentes estadios replicativos encontrados

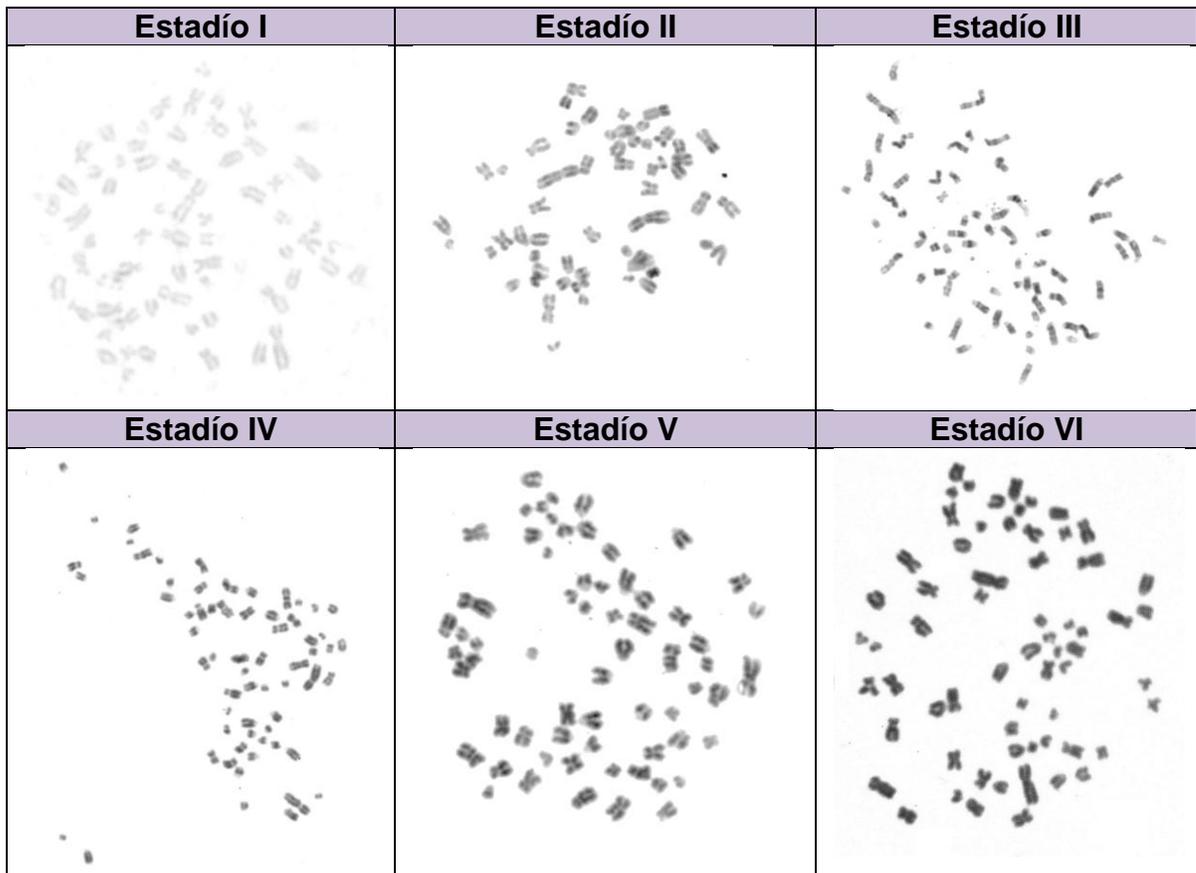


Figura 3-3 Idiogramas de los estadios replicativos de linfocitos de CCC

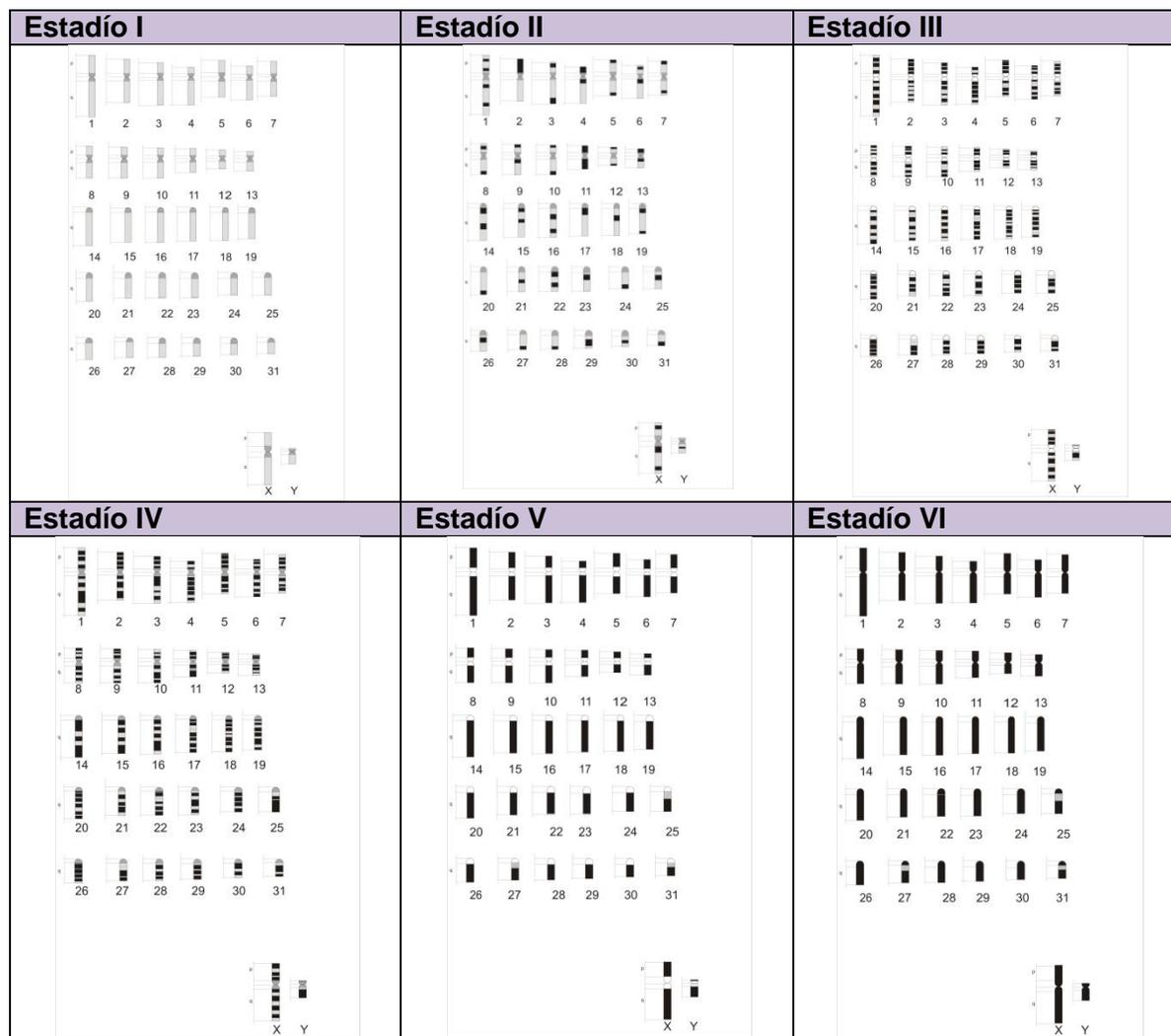


Tabla 3-1. Distribución (porcentaje) de estadios en los diferentes tiempos de exposición a BrdU

	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV	Estadio V	Estadio VI
10 horas	8%	16%	5%	1%	1%	1%
7 horas	1%	1%	21%	3%	1%	1%
4 horas	0%	0%	0%	12%	9%	3%
1 hora	0%	0%	0%	0%	0%	20%

Figura 3-4. Gráfica cronología en la duplicación del genoma CCC

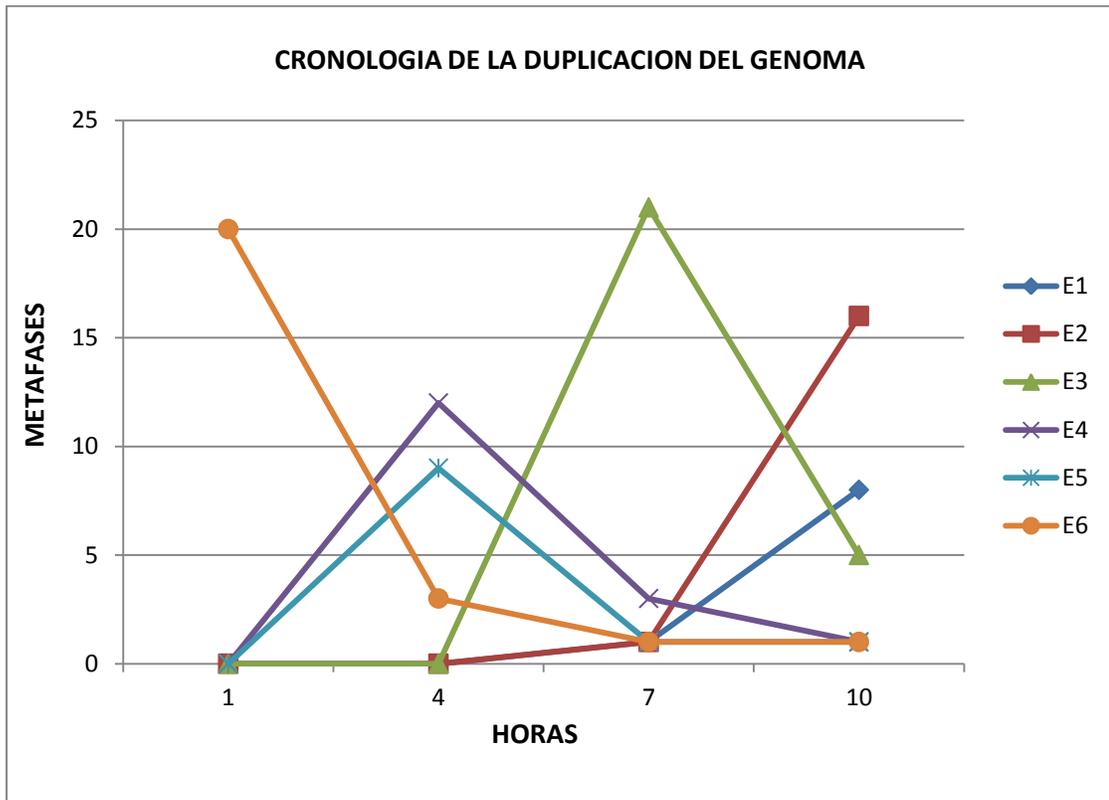


Figura 3-5 Estadíos replicativos (EI, EII, EIII, EIV, EV y EVI) para cromosoma X en Caballo Criollo Colombiano

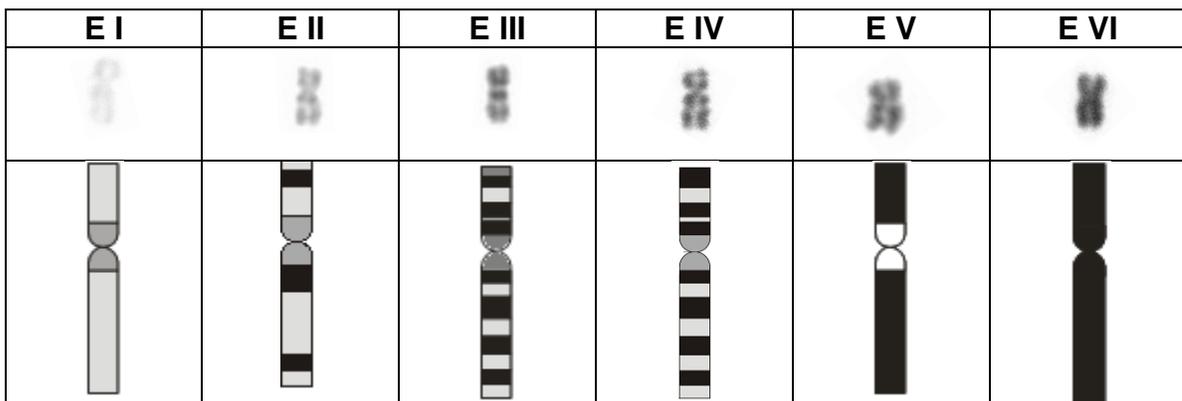
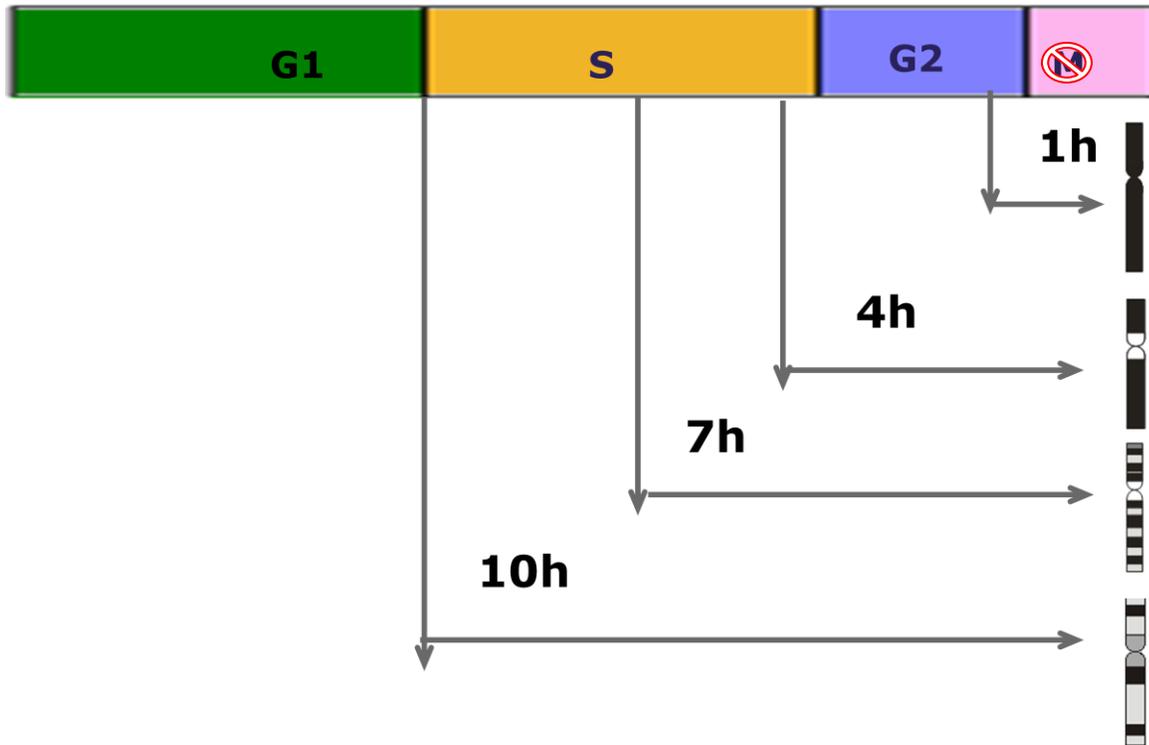


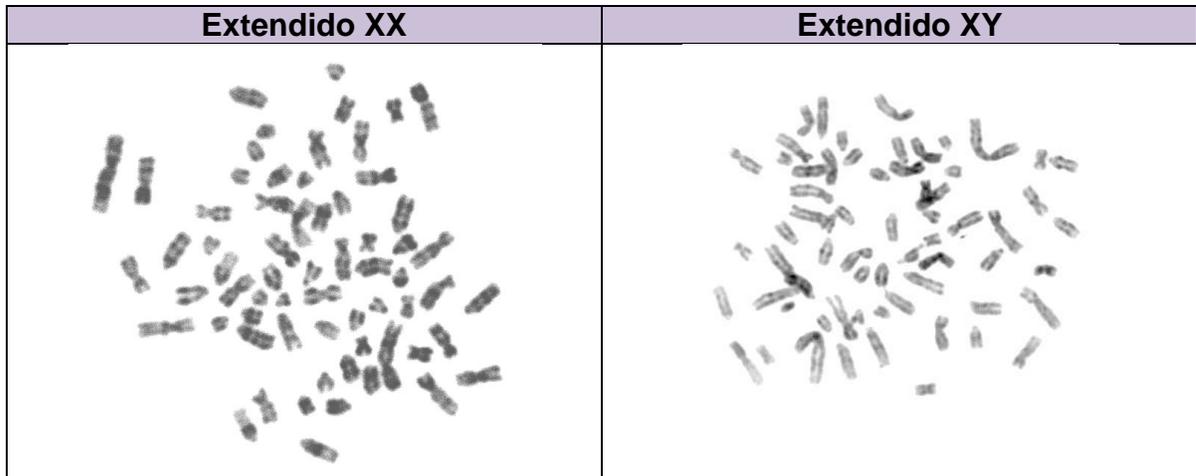
Figura 3-6 Estadíos encontrados para el cromosoma X según el pulso terminal de BrdU



3.2 Bandas R-replicativas

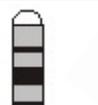
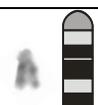
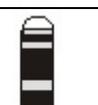
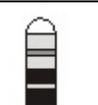
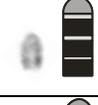
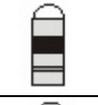
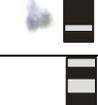
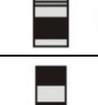
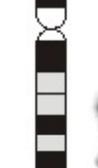
Se encontraron diferencias entre el patrón de bandas R-replicativas entre Caballo Colombiano y Caballo Árabe. Se identificaron regiones cromosómicas activas e inactivas (Camargo y Cervenka, 1980) como se presenta en la figura 3-7.

Figura 3-7. Extendidos cromosómicos de CCC con bandas R-replicativas



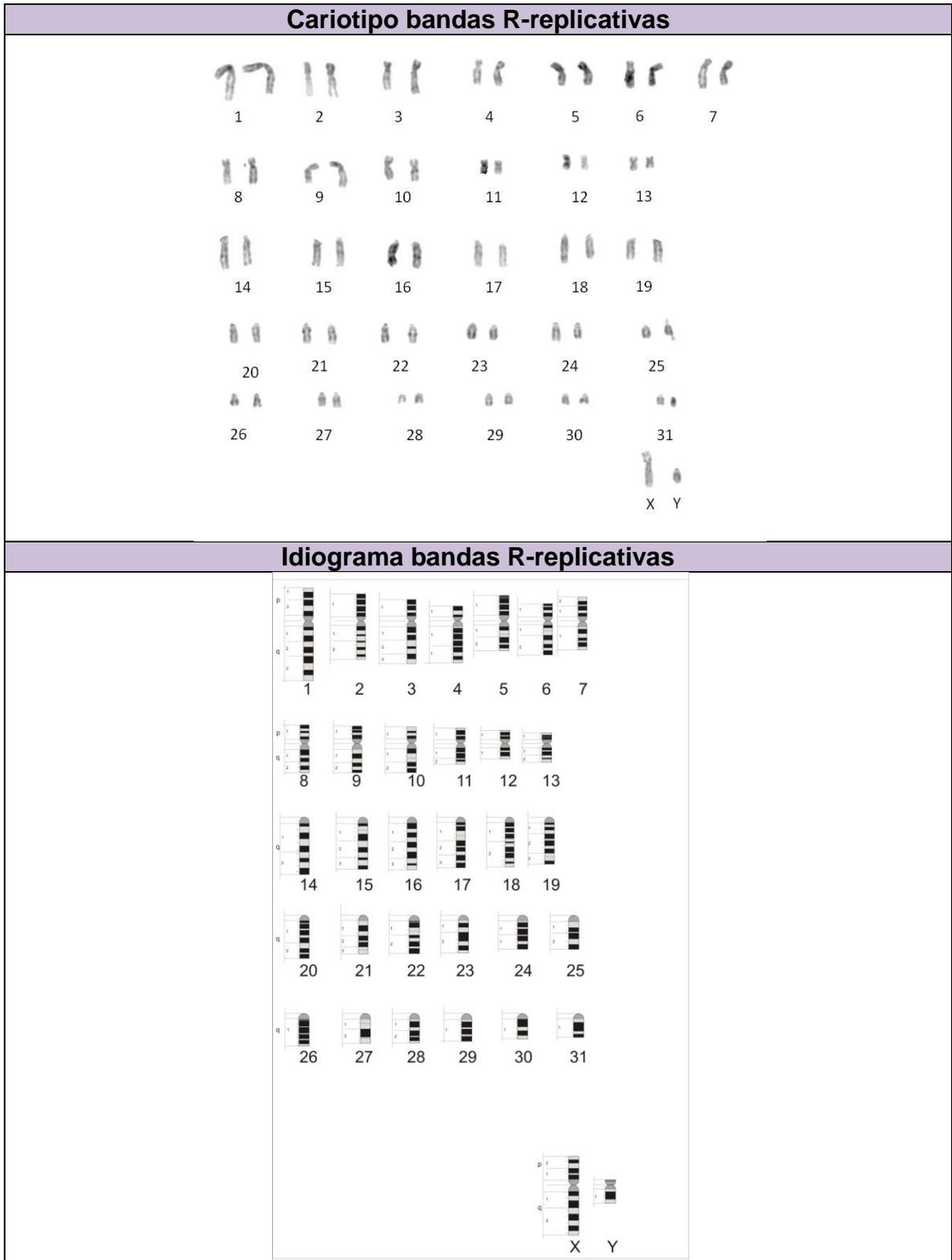
Las diferencias más evidentes para bandas R-replicativas entre CCC y CA, se observaron en los cromosomas 23, 25, 27, 29 y 31 y en el cromosoma X, los cuales se presentan en la tabla 3-2.

Tabla 3-2. Expresiones diferenciales de regiones cromosómicas en CA y CCC

	Caballo Criollo Colombiano	Caballo Árabe
23		
25		
27		
29		
31		
X		

A continuación se encuentran el cariotipo y el respectivo idiograma para bandas R-replicativas en CCC (**Figura 3-8**)

Figura 3-8 Cariotipo e idiograma de CCC con bandas R-replicativas



3.3 Bandas G

La técnica para la obtención de bandas G mediante la inmersión de los extendidos cromosómicos en solución con tripsina, mostró resultados similares al modelo cariológico propuesto en el sistema internacional de nomenclatura citogenética del caballo doméstico ISCNH (1997). En las figuras 3-9 y 3-10 se presentan los extendidos, el cariotipo y el idiograma para este tipo de bandas respectivamente.

Figura 3-9. Extendidos cromosómicos de CCC con bandas G

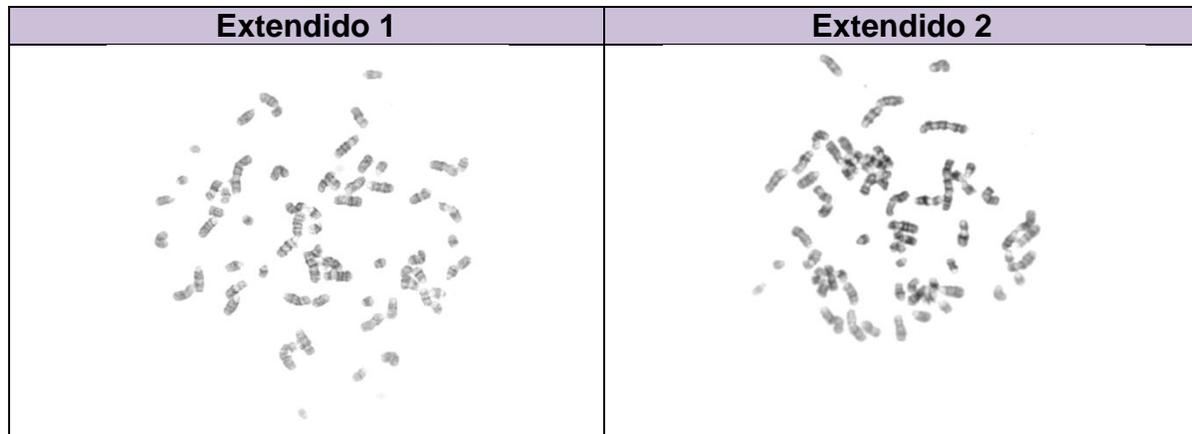
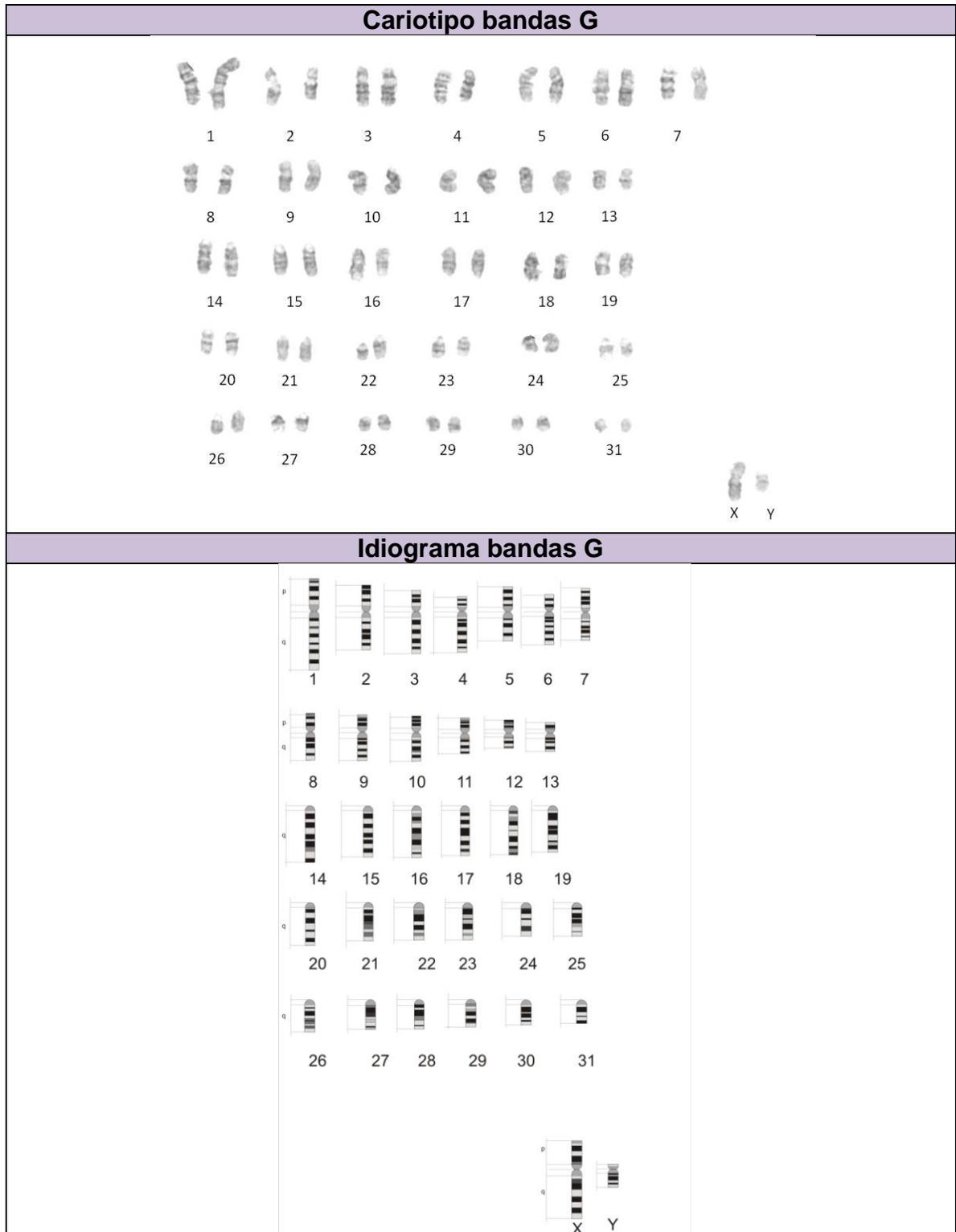


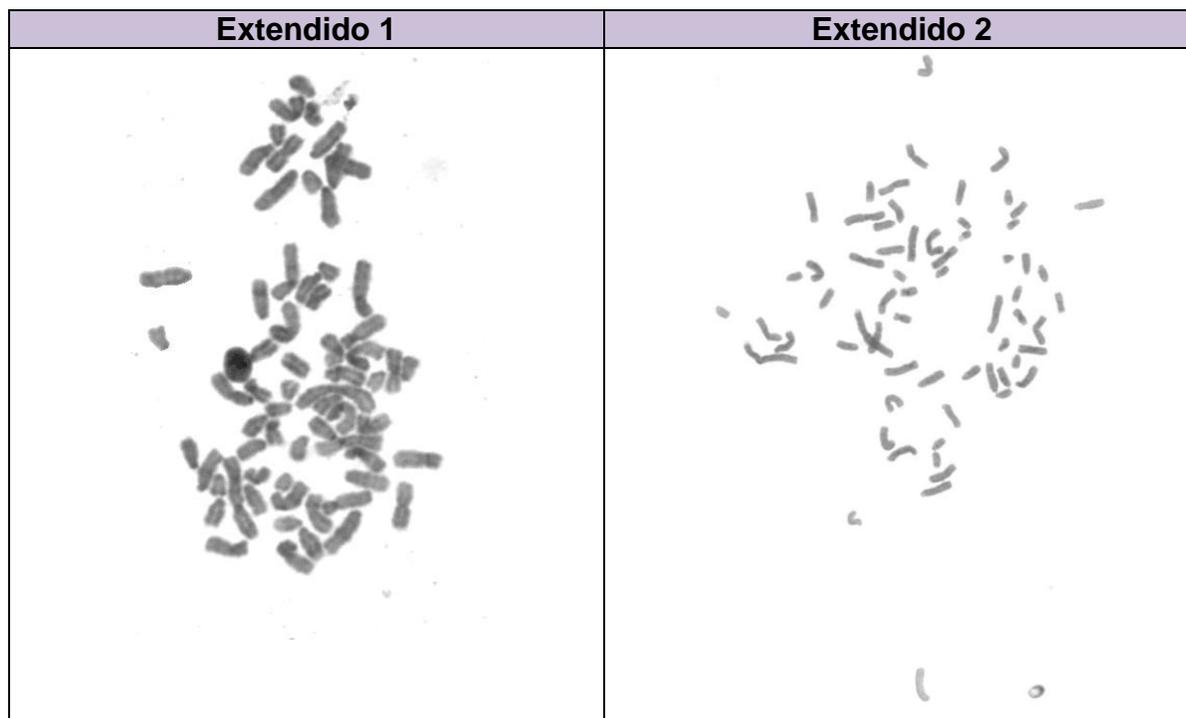
Figura 3-10 Cariotipo e idiograma de CCC bandas G



3.4 Bandas C-G

Las metafases con bandas C-G se muestran a continuación en la figura 3-11. No hay buena resolución de bandas dificultando la realización del idiograma.

Figura 3-11. Extendidos cromosómicos de CCC con Bandas C-G.



3.5 Bandas de restricción

Según Babu (1988) únicamente las enzimas cuyas secuencias de reconocimiento están constituidas por más de cuatro pares de bases, pueden inducir tinción diferencial, por tanto la elección de las enzimas de restricción para este trabajo se fundamentó en este criterio, empleando dos enzimas Dra I y BSP 120I de la casa comercial FERMENTAS las cuales reconocen las secuencias 5'...TTT↓AAA...3' y 5'...G↓GGCCC...3' respectivamente. Así fue posible observar que estas enzimas producen un patrón de bandas (Figura 3-12) que permite la identificación de los pares homólogos y por ende la realización del cariotipo de restricción del CCC como se muestra en las figuras 3-13, y 3-14 para BSP 120I y DraI respectivamente. Adicionalmente, se realizó digestión con la enzima Rsa I *fast digest* (FERMENTAS) la cual reconoce la secuencia 5'...GT↓AC...3'; no obstante los bandas observadas no fueron tan nítidas probablemente por la magnitud estructural de las dianas.

Figura 3-12. Extendidos cromosómicos de CCC con bandas de Restricción

Bandas de restricción con enzima Dra I	Bandas de restricción con enzima BSP 120I
	

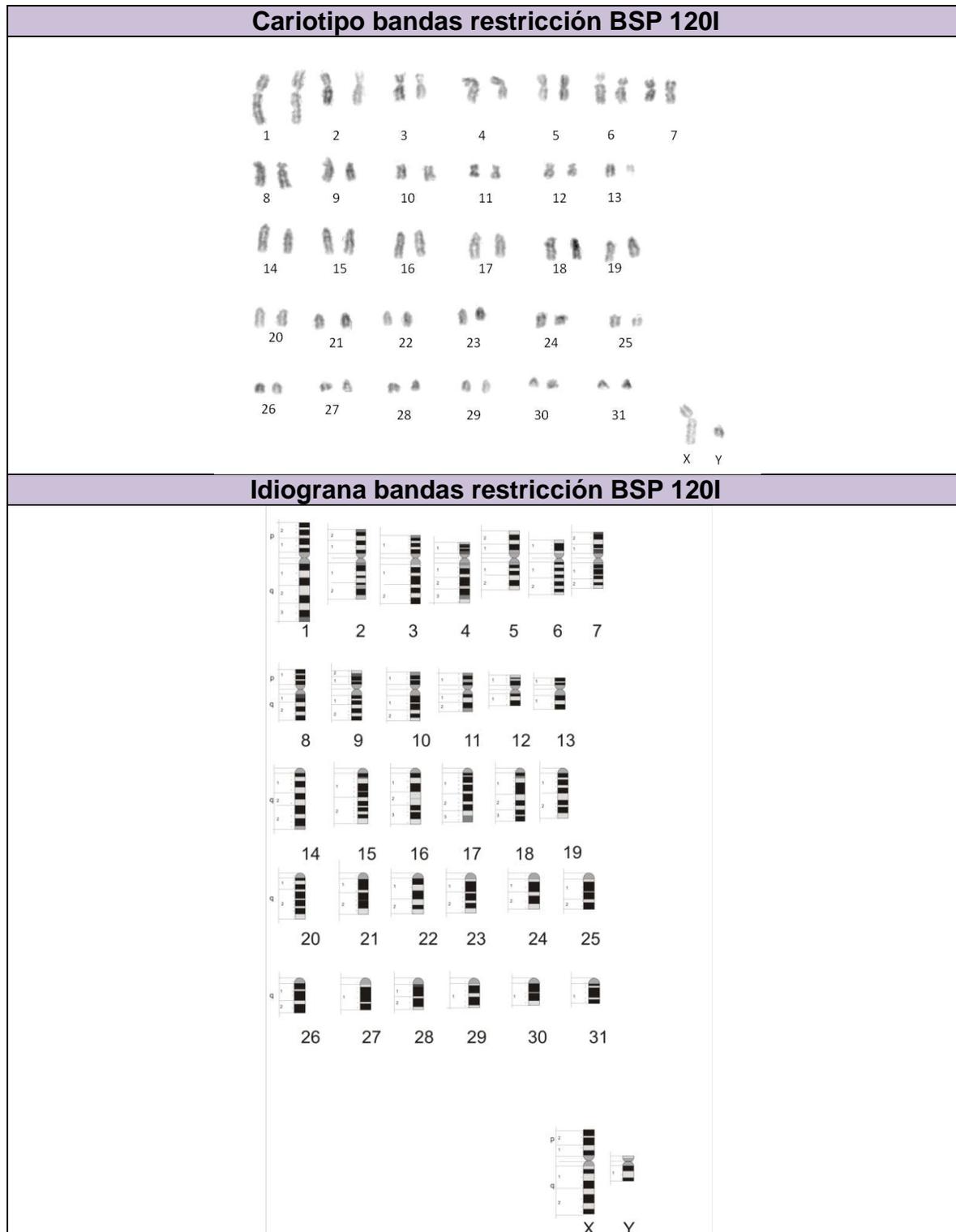
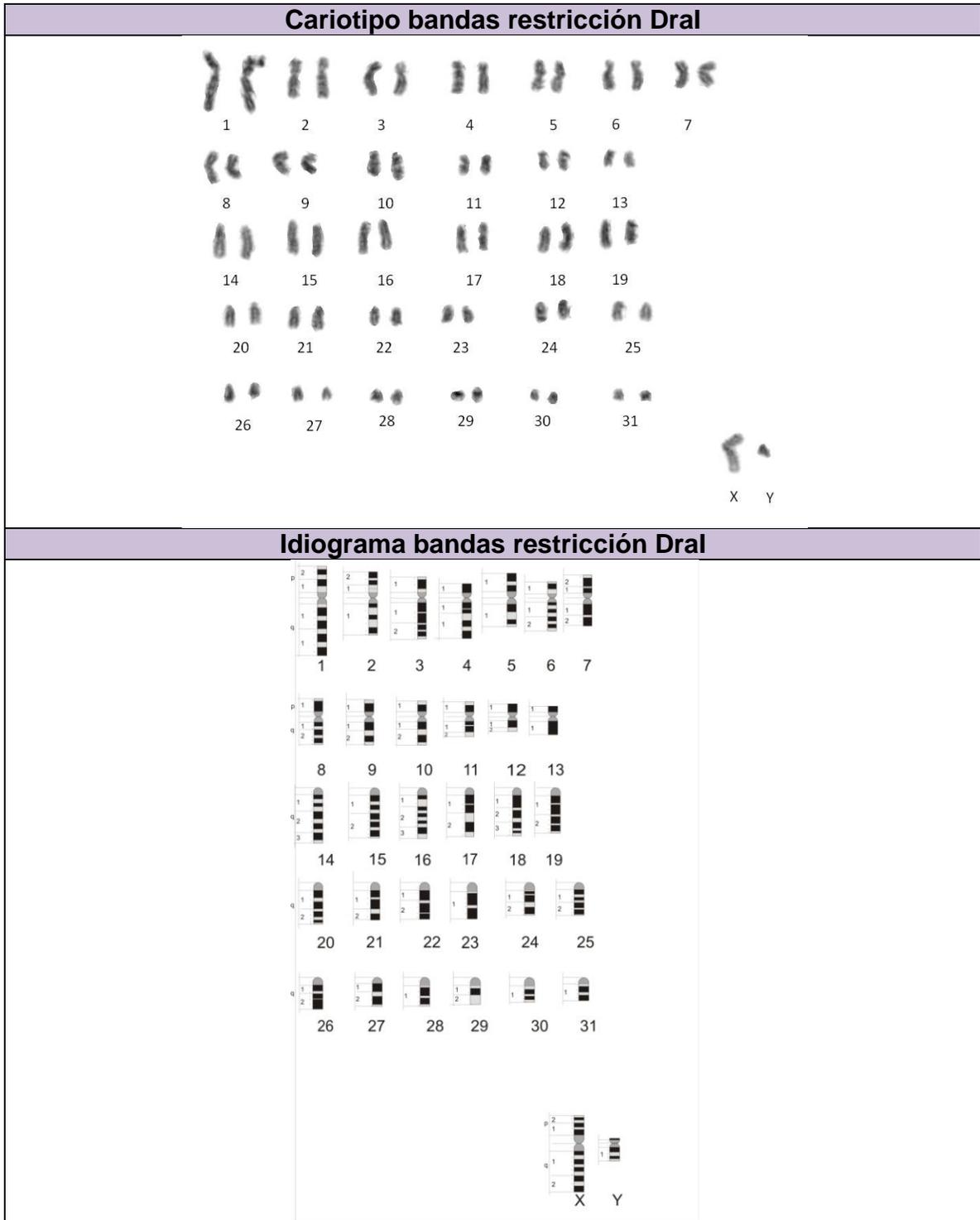
Figura 3-13 Cariotipo e idiograma CCC bandas de restricción Enzima BSP 120I

Figura 3-14 Cariotipo e idiograma CCC bandas restricción enzima Dral



3.6 Bandas C

Las bandas C de los equinos analizados se localizaron en la región centromérica, además de los extremos de los brazos p de los cromosomas 1, 2 y 3, y los extremos terminales de los cromosomas acrocéntricos 16, 24 y en machos en el cromosoma Y como se muestra en la figura 3-16.

Figura 3-15. Extendidos cromosómicos de CCC con Bandas C

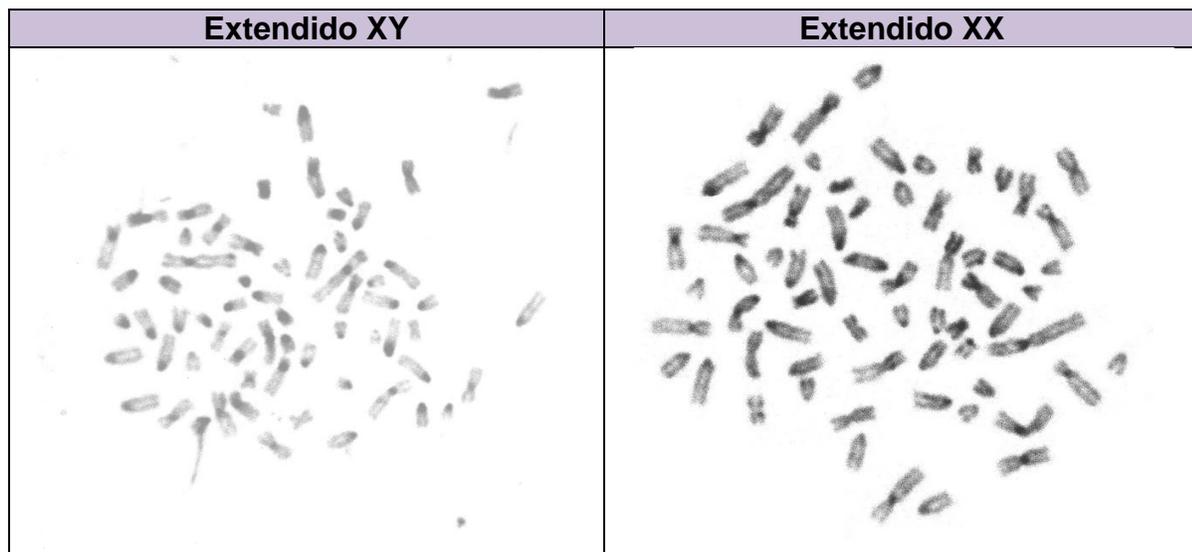
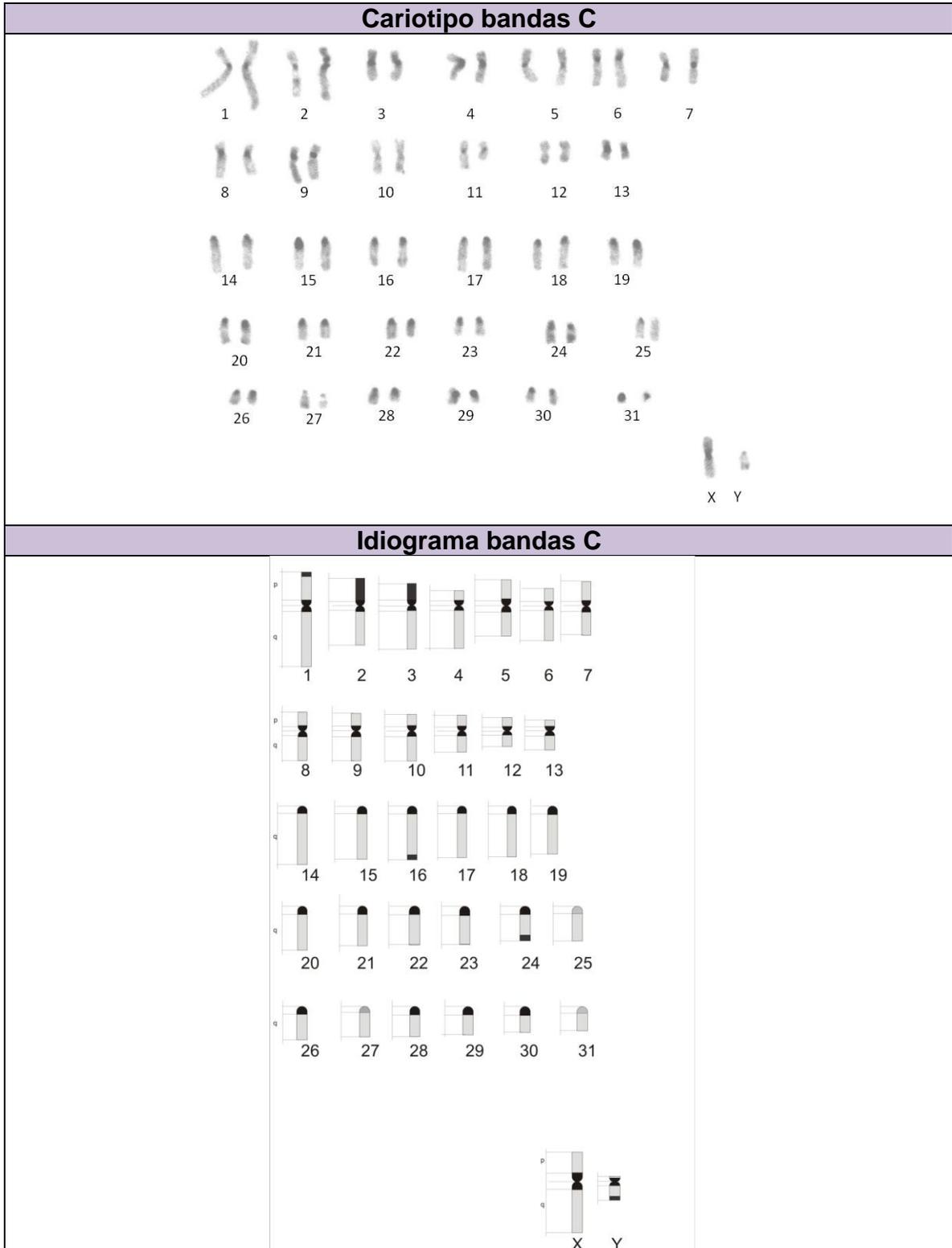


Figura 3-16 Cariotipo e idiograma CCC bandas C



3.7 Bandas NOR

En el presente trabajo para CCC se identificaron como portadores de NOR activos cuatro pares de cromosomas: 1, 25, 28 y 31, mientras que en CA se detectaron solamente 2 pares de cromosomas con bandeado NOR 1 y 31 (Figura 3-17); no se observaron diferencias entre machos y hembras evaluadas, sin embargo no siempre se presentaron en estado homocigoto. En la tabla 3-3 se presentan las frecuencias halladas; en la figura 3-18 se muestran algunos polimorfismos encontrados en las bandas NOR (diferencias de tamaño) y en la figura 3-19 se observan las asociaciones cromosómicas formando el nucléolo.

Tabla 3-3. Frecuencia de bandas NOR en cromosomas equinos

INDIVIDUO	RAZA	SEXO	# NOR	CROMOSOMAS Y FRECUENCIA			
				1 (2)	25 (2)	28 (1)	31 (2)
1	CCC	M	6	1 (2)	25 (2)	28 (1)	31 (2)
2	CCC	H	4	1 (2)	31 (2)	-	-
3	CCC	M	5	1 (2)	25 (1)	31 (2)	-
4	CCC	M	5	1 (2)	25 (1)	31 (2)	-
5	CCC	M	5	1 (2)	25 (1)	31 (2)	-
6	CCC	M	6	1 (2)	25 (2)	31 (2)	-
7	CCC	M	6	1 (2)	25 (2)	31 (2)	-
8	CCC	H	7	1 (2)	25 (1)	28 (2)	31 (2)
9	CCC	H	5	1 (2)	25 (1)	31 (2)	-
10	CCC	H	6	1 (2)	29 (2)	31 (2)	-
11	CCC	H	6	1 (2)	25 (2)	28 (2)	-
12	CCC	H	5	1 (2)	25 (1)	31 (2)	-
13	CA	M	4	1 (2)	31 (2)	-	-
14	CA	H	4	1 (2)	31 (2)	-	-

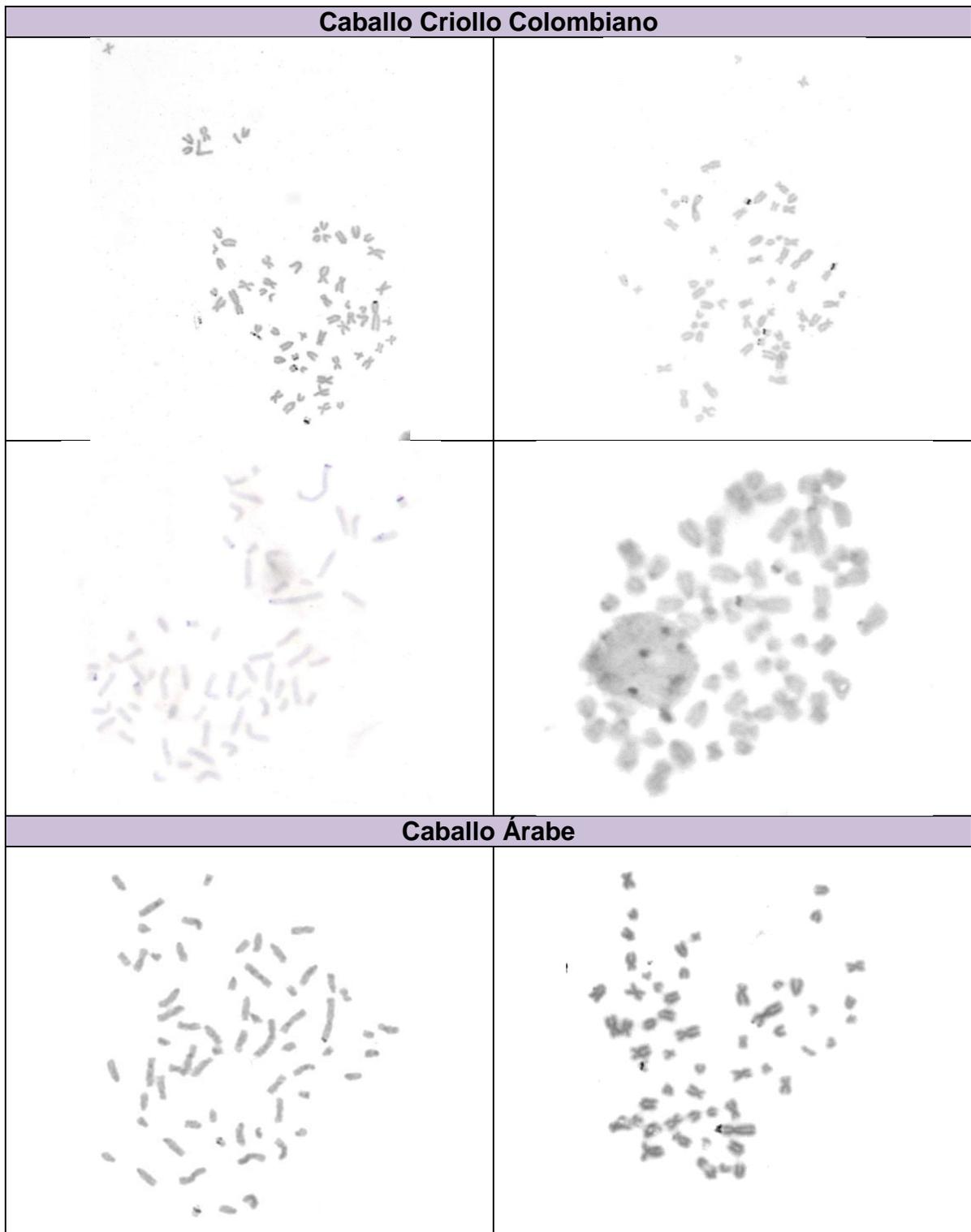
Figura 3-17. Extendidos cromosómicos de CCC y CA con bandas NOR

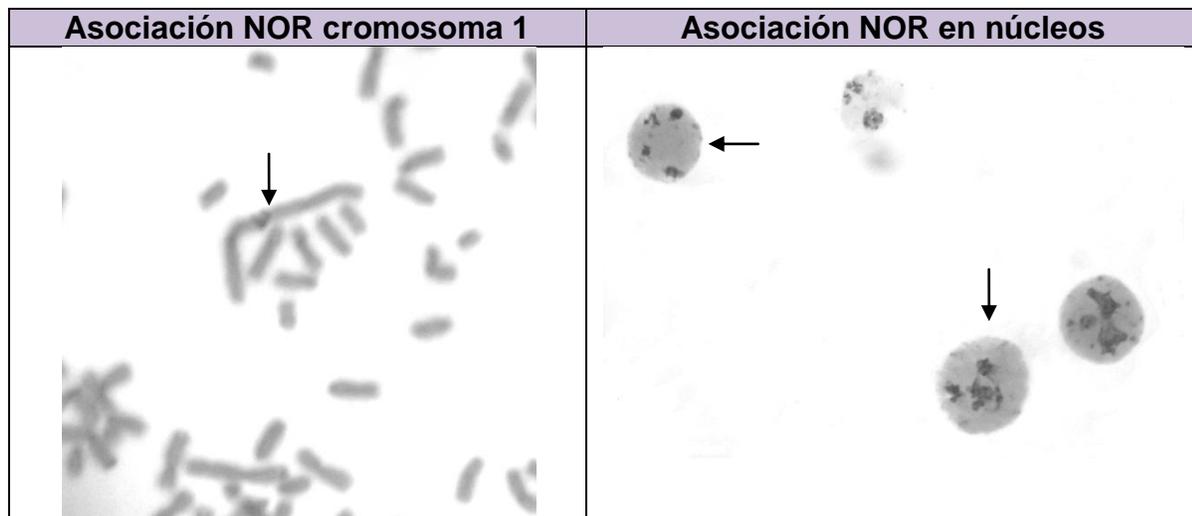
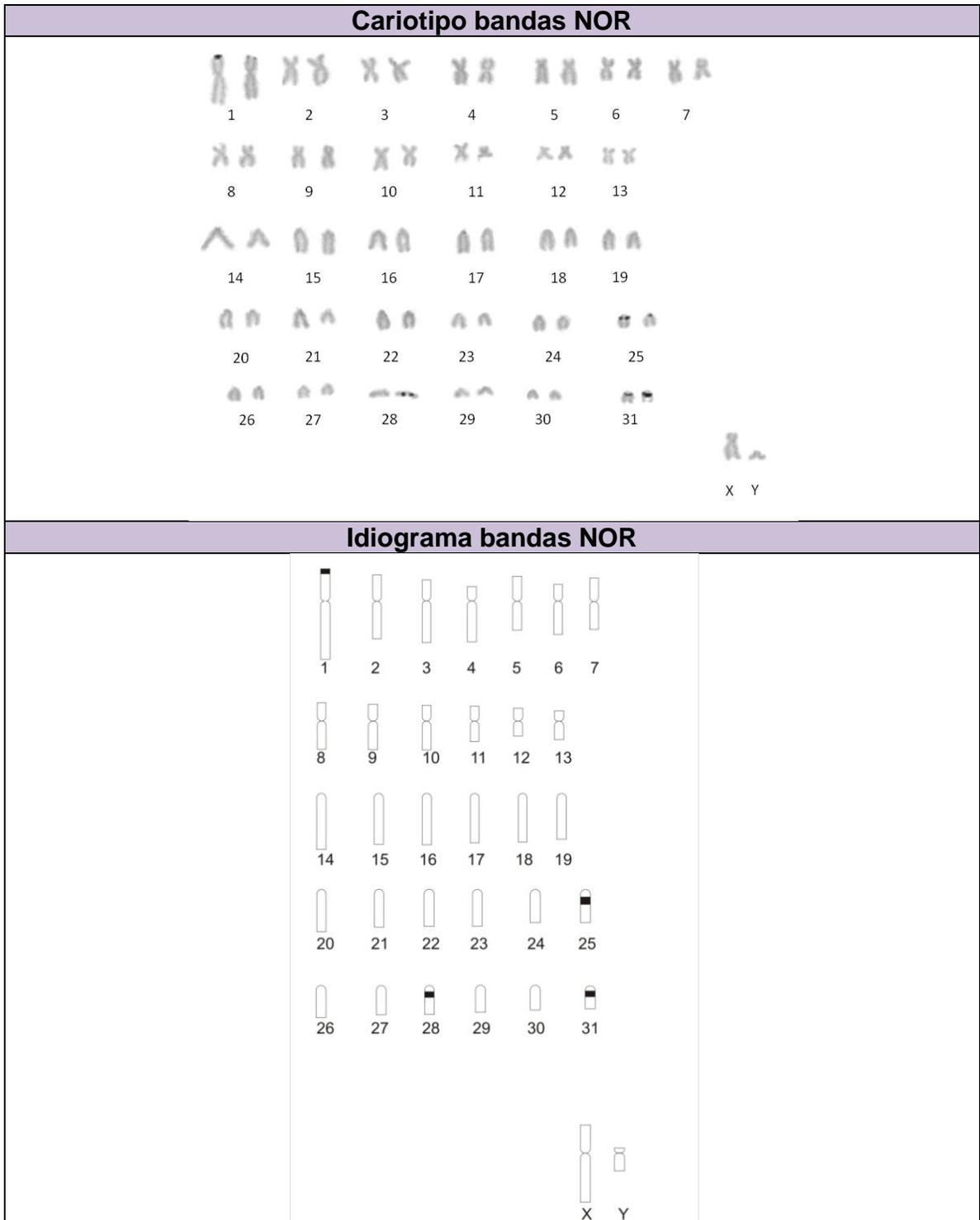
Figura 3-18- Polimorfismos NOR cromosoma 1 CCC**Figura 3-19. Asociaciones cromosómicas de las Regiones Organizadoras del nucléolo**

Figura 3-20 Cariotipo e idiograma bandas NOR CCC



Al realizar el análisis estadístico se observó que existe una diferencia significativa al comparar al CCC con el CA, sin embargo no hubo diferencia estadística significativa entre machos y hembras CCC, ni entre los diferentes andares. En la tabla 3-4 se muestran las pruebas de variabilidad tanto paramétrica como no paramétrica.

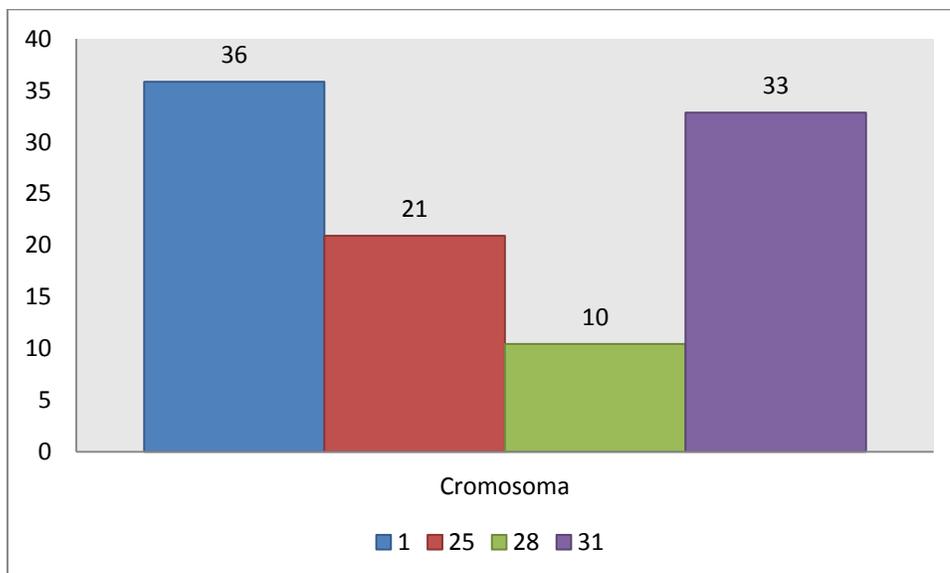
Tabla 3-4. Prueba de Variabilidad Bandas NOR CCC y CA

PRUEBA	DIFERENCIA	VALOR P
KRUSKAL-WALLIS	SI	0.0346*
T STUDENT	SI	0.0245 *

*Diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$)

La prueba de homogeneidad de proporciones (X^2) mostró diferencias significativas para la frecuencia de bandas NOR en los cromosomas descritos, con $p = 0.0455$, presentándose las mayores diferencias entre los cromosomas 1 – 25 ($p = 0.0455$), 1 – 28 ($p = 0.0047$), 31 – 28 ($p = 0.0106$); lo que nos indica una mayor frecuencia de NOR en los cromosomas 1 y 31 y menor en el cromosoma 28, como se muestra a continuación en la figura 3-21.

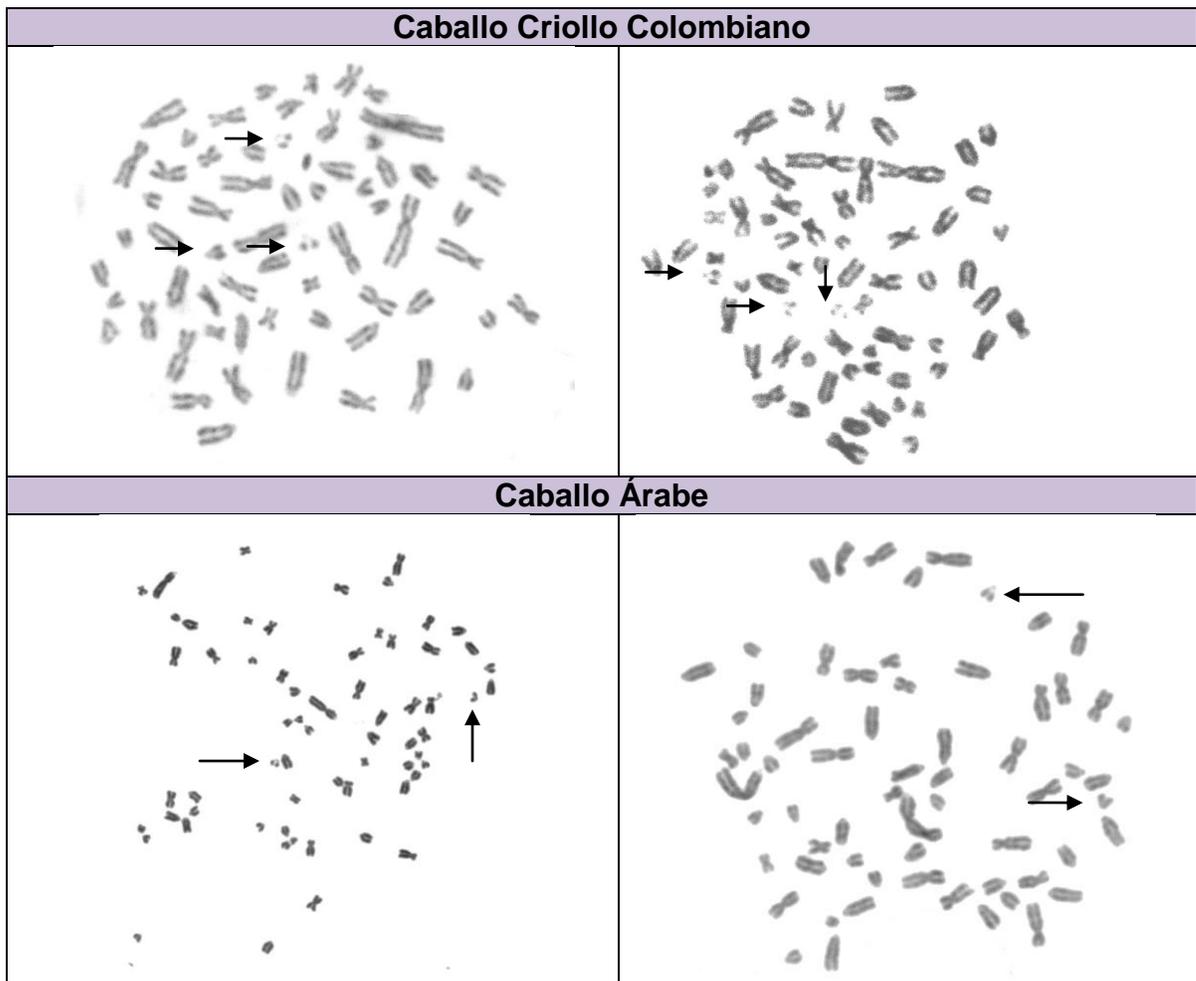
Figura 3-21 Grafica de Frecuencia Cromosómica NOR en CCC



3.8 Polimorfismos

Además de las expresiones diferenciales de genes, evidenciadas gracias a la técnica de bandeo R-replicativo, en Caballo Criollo Colombiano se detectaron tres cromosomas polimórficos, marcadores poblacionales, identificados como el 25, 27 y 31, en Caballo árabe el par homólogo 31 fue identificado como polimórfico (Figura 3-22). Para ambas razas el resto de pares cromosómicos son estructuralmente similares, no se observaron alteraciones. En la tabla 3-5 se muestran los tres cromosomas polimórficos de CCC con las diferentes técnicas de bandeo.

Figura 3-22. Extendidos con tinción homogénea: Cromosomas Polimórficos CCC y CA



Las flechas señalan los cromosomas polimórficos

Tabla 3-5 Cromosomas Polimórficos CCC con diferentes bandeos

	Cromosoma 25	Cromosoma 27	Cromosoma 31
Bandas R-replicasivas			
Bandas G			
Bandas C			
Bandas Restricción BSP 120I			
Bandas Restricción Dral			
NOR			
Homogéneo			

4. DISCUSION

En este trabajo, se presentan por primera vez los cariotipos y los respectivos idiogramas con bandeos G, R-replicativo, C, NOR y restricción del Caballo Criollo Colombiano. Inicialmente se evaluaron los medios de cultivo Ham F-12 suplementado con glutamina y RPMI 1640; con éste, se logró mayor número de metafases y mejor morfología cromosómica. Por otro lado, se encontró aglutinación en la muestra de sangre, lo que no permitió la estimulación celular y por tanto la obtención de mitosis. Por esa razón, se adicionó heparina 1% al medio de cultivo, lo cual disminuyó la aglutinación, permitió la estimulación de los linfocitos y un buen número de extendidos cromosómicos de alta calidad.

Como se ha reportado para el caballo doméstico, nuestro caballo criollo presentó un $2n=64$, distribuidos así: 13 pares metacéntricos o submetacéntricos (cromosoma X el segundo más grande) y 18 acrocéntricos (cromosoma Y uno de los más pequeños). Las bandas C mostraron que la heterocromatina constitutiva se localiza en los centrómeros de los cromosomas, en la región terminal del brazo corto del cromosoma 1, a lo largo del brazo corto de los cromosomas 2 y 3 y en la región terminal del brazo largo de los cromosomas 16, 24 y del cromosoma Y. Los cromosomas marcadores no presentaron bandas C, lo que nos indica que son altamente eucromáticos y por tanto activos a nivel transcripcional.

La frecuencia de corte de las enzimas de restricción se relaciona directamente con el número de bases que componen la secuencia que reconocen (Babu, 1988); en el presente trabajo el uso de enzimas de restricción Dra I y BSP 120I sobre los cromosomas fijados, produjo un patrón de bandas que indica la presencia de una gran cantidad de secuencias "diana" a lo largo del cromosoma, donde las regiones que aparecen claras corresponden a los lugares donde hubo digestión enzimática (Figura 3-12), sin embargo se presume que la acción enzimática podría estar limitada por la conformación de la cromatina (Mezzanotte et al, 1985; Burholder, 1989). Esta metodología cobra importancia al momento de estudiar regiones heterocromáticas y ADN satélite, para lo cual se espera un patrón de bandas constante a través de los genomas. Aunque fue posible la obtención de bandas mediante el uso de las dos enzimas de restricción para cromosomas de equinos permitiendo realizar el cariotipo, se encontró una mejor resolución de bandas con la enzima BSP 120I

Las regiones NOR activas se expresan citológicamente al iniciarse la síntesis (Brown, 1966) y representan los sectores del cromosoma que contiene los genes para la transcripción del rRNA (Ritossa & Spiegelman, 1965; Wallace & Birnstiel,

1966) Varios autores que han estudiado NORs en equinos difieren en los resultados encontrados, por ejemplo, se reportó su presencia en los telómeros del brazo corto del cromosoma 1 (Lui et al, 1990), en la región adyacente del cromosoma 25 y en la región proximal del brazo largo del cromosoma 31 (Lui et al, 1990), además, se mostró que siempre están presentes en los cromosomas homólogos 1 y 31 pero en algunas metafases sólo se encuentra en un homólogo del cromosoma 25 (Lui et al, 1990).

En los últimos años, se determinó para el equino doméstico NOR en los cromosomas 1, 27, 28 y 31 (Svetlana et al, 1998; Raudsepp et al. 2000; Slota et al 2007; Wnuk et al, 2012). Los resultados obtenidos en este trabajo, detectaron NORs en cuatro pares de cromosomas: 1, 25, 28 y 31, siendo constantes en los homólogos 1 y 31 y eventuales en solo un cromosoma de cada par 25 y 28. (Figuras 3-17 y 3-20)

El número de cromosomas que presentan regiones NOR es diferente para cada especie; incluso en un estudio realizado en sementales bovinos se demostró que el patrón de bandas NOR era característico de cada animal (Mayr et al, 1987), lo mismo ocurre con el tamaño de estas regiones en los diferentes cromosomas (polimorfismos) Figura (3-18) (Goodpasture, 1975; Varley, 1977) características que pasan de generación en generación (Fleming 1981). Estos polimorfismos se originan en la actividad y número de copias de genes de rRNA contenidas en esas regiones (Svetlana et al, 1998). Sin embargo existe un aspecto crítico respecto a estos polimorfismos, ya que las NOR están relacionadas con la viabilidad celular, así pocas copias de rRNA podrían conducir a organismos no viables (Svetlana et al, 1998); por ejemplo, en pollos, el tamaño reducido de las NOR en estado homocigoto se ha asociado con mortalidad embrionaria (Delany y Bloom 1993). No obstante, la ausencia y/o el incremento de tamaño de las NOR podría ser resultado de un sobre cruzamiento (Slota et al, 2007) de estas regiones durante la asociación de los cromosomas involucrados (para formar el nucléolo), sean homólogos o no, hecho que no afectaría la viabilidad celular (Svetlana et al, 1998) (Figura 3-19).

La diferencia en la frecuencia cromosómica, es decir que las bandas NOR sean más constantes en los cromosomas 1 y 31, coincide con lo encontrado por Svetlana (1998) y Slota (2007) en las diferentes razas que fueron evaluadas, Slota (2007) sugiere que la ausencia de las Ag-NOR es un fenómeno epigenético causado principalmente por mecanismos de metilación. Sin embargo el mismo autor también sugiere que la metilación no es la única respuesta a la inactivación de las NOR, ya que en su estudio un ejemplar mostró con FISH, hipometilación en las NOR del cromosoma 28, correspondiente a rDNA pero no respondió a la tinción con plata, como información adicional, dicho ejemplar se referenció como el animal de mayor edad entre los muestreados; así surge la hipótesis de que la expresión de las NORs está asociada con el acortamiento de los telómeros y el envejecimiento celular (Allsopp et al, 1992; Rosete et al, 2007) lo cual podría conllevar a la liberación de los telómeros de proteínas de unión al nucléolo lo que

podría causar un bloqueo en la actividad transcripcional. (Guarente, 1997a, b; Kennedy et al 1997)

Los individuos CCC que presentaron el mayor número de NOR, se dedican a actividades reproductivas y/o se encuentran en proceso de adiestramiento, lo cual podría estar relacionado genéticamente. Por otro lado, los resultados de bandas NOR para CA, no pueden ser generalizados para toda la población de la raza ya que como se ha evidenciado en estudios anteriores, este patrón de bandeado puede ser propio de cada individuo; además otros autores reportan la presencia de NOR en hasta cuatro pares de cromosomas en varias razas de caballos estudiados, incluida la raza Árabe. Estas diferencias en las expresiones de las bandas NOR también se pueden explicar por efecto filogenético y/o ontogenético, según la edad del individuo, ya que los ejemplares CCC muestreados se encuentran entre los 3 y los 10 años de edad, mientras los ejemplares árabes no superaban los 40 meses

Respecto a la determinación exacta de los cromosomas en los cuales se presentan las bandas NOR en el equino, se ha mencionado que difiere entre los diferentes autores y a su vez con el presente trabajo; sin embargo al realizar la medición de los cromosomas involucrados, los resultados indicaron que para el Caballo Criollo Colombiano, los NOR activos se encuentran en los cromosomas 1, 25, 28 y 31.

Para inferir el comportamiento replicativo de la cromatina, se utilizó incorporación de BrdU con el fin de determinar las regiones activas de replicación temprana e inactivas de replicación tardía (Camargo y Cervenka, 1980). Para el caso del caballo criollo, se pudieron observar seis estadios replicativos, el más frecuente el estadio II (10 horas), el estadio III (7 horas), estadios IV y V (4 horas) y el estadio VI (1 hora) .(tabla 3-1, figura 3-6)

El hallazgo de los cromosomas polimórficos marcadores poblaciones se logró incluso en aquellas mitosis coloreadas homogéneamente y corresponden a una filogenia citogenética que se conserva a través del tiempo; de hecho el cromosoma 31 en el CA es también polimórfico en estado homocigoto, lo que nos indica que el CCC conserva ese polimorfismo de su antepasado más lejano. Dichos cromosomas marcadores podrían considerarse marcadores genéticos si se logra determinar su correlación con características específicas. Así mismo, encontrar estos marcadores en heterocigosis, constituye una herramienta de aproximación, para la evaluación del grado de homogeneidad genética en los ejemplares. Este hallazgo podría ser fundamental en el momento de determinar si el CCC es realmente una raza o una población heterogénea. Como dato adicional, cabe resaltar que dos de los cromosomas marcadores, presentan expresión de NOR activos (25 y 31).

Aunque en general se encontró que el patrón de las diferentes bandas analizadas se conserva en la especie, las expresiones diferenciales de bandas dadas por

activaciones o inactivaciones de regiones cromosómicas específicas halladas en CCC gracias a la técnica de R-replicativo y la aparición de los cromosomas marcadores, podrían deberse a la divergencia genética existente producto de la introgresión de las razas equinas traídas por los españoles al continente americano sumado a los procesos de evolución y adaptación.

En Colombia se habla de Caballo Criollo aproximadamente desde 1860, momento en el cual empiezan a cuantificarse y destacarse los diferentes andares, los cuales surgen de la necesidad de desplazarse cómodamente (tanto el jinete como el animal) por grandes distancias en la especial topografía de nuestro país (terrenos montañosos con altas pendientes). Estas condiciones de hábitat y selección (ambiental y cultural) probablemente dieron origen a estas expresiones diferenciales y a nuevas formas cromosómicas en CCC, observadas en 3 de sus cromosomas acrocéntricos más pequeños, apoyando la idea del “Modelo del Cariotipo Adaptativo” (Bickham y Baker 1979), el cual indica que bajo determinadas circunstancias la selección favorece la incorporación de una nueva forma cromosómica siempre y cuando esta nueva forma proporcione un beneficio genético al portador, que el beneficio lo posea tanto el heterocigoto como el homocigoto y que la magnitud del beneficio supere la disminución de la fertilidad del heterocigoto (García, 2001).

Por otro lado, aunque la población evaluada en este trabajo es pequeña, los resultados obtenidos hasta el momento no arrojan diferencias entre los cariotipos de los animales de los distintos andares. Esto podría de alguna forma orientarnos a descubrir que, tal vez, el CCC nace con la misma capacidad para desarrollar cualquier andar; es decir, que el paso es adquirido y no heredado como siempre se ha especulado. Gran ejemplo de esto lo tenemos en el Caballo Criollo Colombiano más famoso de la historia, “Don Danilo”, el cual ejecutaba las cuatro modalidades: el trote, el galope, la trocha y el paso fino Colombiano, siempre desplazándose según la orden de su jinete (Bravo, 2001).

A pesar de que este estudio es el pilar de la caracterización completa para CCC, las homologías halladas en las bandas para la población muestreada y las diferencias con los cariotipos de otro grupo genético, la distribución de la heterocromatina y la expresión de los NOR activos en los extendidos cromosómicos, nos podrían indicar que el Caballo Criollo Colombiano puede catalogarse como grupo genético.

Para determinar específicamente los genes que se expresan diferencialmente es necesario emplear técnicas moleculares más precisas como QRT-PCR y Western Blot, así mismo sería interesante continuar con estudios donde se correlacione la actividad física y reproductiva con la activación de los NOR no solo en CCC, además de continuar con las comparaciones entre las diferentes edades y andares, lo que sería de provecho para caracterizar y ampliar el conocimiento de nuestro caballo, con el fin de detectar diferencias con otras poblaciones, tan alejadas como la Andaluz o tan cercanas como el Caballo de Paso Peruano.

5. CONCLUSIONES

Se reporta por primera vez el cariotipo e idiograma mediante los bandeos R-replicativo, NOR, C y de restricción para el Caballo Criollo Colombiano.

Se reporta por primera vez el patrón de cronología de la duplicación del Genoma en linfocitos de sangre periférica del Caballo Criollo Colombiano, conseguido mediante la aplicación de pulsos terminales diferenciales de BrdU.

El Caballo Criollo Colombiano posee el número y la clasificación cromosómica de la especie *Equus caballus* así: 64 XX ó 64 XY, de sus autosomas, 13 pares son metacéntricos o submetacéntricos y 18 pares son acrocéntricos.

La obtención de bandas R-replicativas evidencia una expresión diferencial de genes en CCC y la utilidad de la técnica en la detección de alteraciones de los cromosomas sexuales como el X inactivo, importante en el diagnóstico de casos de mosaicismos crípticos: XX/XXX/X.

Se evidencia la presencia de tres cromosomas polimórficos marcadores poblacionales (25, 27 y 31) en el Caballo Criollo Colombiano, hallazgo que permite comenzar a inferir sobre la autenticidad de la raza.

Se encontraron polimorfismos en número y tamaño en la expresión de las bandas NOR en CCC comparado con CA, no obstante, no se observó ninguna diferencia dentro de los ejemplares de CCC evaluados.

La medición de los cromosomas permitió demostrar que las regiones NOR para CCC se encuentran presentes en los cromosomas 1, 25, 28 y 31.

La obtención de bandas mediante enzimas de restricción especialmente BSP 120I, proveen un patrón de bandeo útil para análisis cariotípico y homología en CCC, análisis de la heterocromatina y ADN satélite.

Las homologías halladas en las bandas para la población muestreada de CCC y las diferencias con los cariotipos de CA, podrían indicar que el caballo criollo puede catalogarse como grupo genético.

La adición de 1% de heparina en el medio de cultivo proporciona una adecuada estimulación por fitohemaglutinina de los linfocitos T equinos, a la vez que disminuye la aglutinación sanguínea en el cultivo.

Por último, los resultados reportados contribuyen a la caracterización del Caballo Criollo Colombiano, y a la vez proporciona una herramienta de diagnóstico útil en pruebas de paternidad o parentesco y en procesos de selección, reproducción y conservación.

Anexo 1

Inventario equino, asnal y mular por departamento. Año 2009

Departamento	Equinos			Asnal			Mular		
	Machos	Hembras	Total	Machos	Hembras	Total	Machos	Hembras	Total
Número de cabezas									
<i>Total nacional</i>	1.405.593	1.099.987	2.505.579	134.315	86.531	220.846	221.547	211.430	432.977
Antioquia	153.608	126.513	280.121	8.636	4.850	13.486	51.220	41.564	92.783
Atlántico	6.179	5.970	12.149	2.268	1.628	3.896	2.295	1.903	4.199
Bolívar	27.730	27.536	55.266	10.023	5.639	15.661	11.072	8.417	19.489
Boyacá	38.632	24.979	63.612	4.180	3.818	7.998	5.001	8.107	13.108
Caldas	18.374	17.471	35.845				6.333	8.222	14.555
Casanare	123.697	131.652	255.350	4.236	4.250	8.486	8.773	12.638	21.411
Cauca	37.869	26.781	64.651				958	4.251	5.209
Cesar	44.019	44.823	88.843	11.238	9.824	21.062	14.401	12.450	26.851
Córdoba	210.405	144.470	354.874	27.132	10.140	37.271	21.758	17.367	39.126
Cundinamarca	63.573	55.615	119.188	3.848	2.754	6.602	10.526	12.514	23.040
Huila	30.240	23.690	53.930	1.559	1.252	2.811	2.509	3.216	5.725
La Guajira	9.406	9.425	18.831	14.487	14.341	28.828	3.644	3.415	7.059
Magdalena	30.508	31.641	62.149	17.202	7.571	24.773	14.559	12.194	26.753
Meta	101.085	71.898	172.983	796	481	1.277	6.214	8.845	15.059
Nariño	17.462	7.281	24.743				132	1.149	1.281
Norte de Santander	19.712	11.588	31.300	2.052	849	2.901	10.673	8.314	18.986
Santander	48.714	32.159	80.873	1.029	658	1.687	17.888	16.046	33.934
Sucre	44.078	28.682	72.760	15.137	8.518	23.656	8.153	5.317	13.470
Tolima	41.379	36.575	77.955	2.761	1.961	4.722	8.311	8.204	16.515
Valle del Cauca	30.610	28.007	58.616			-	5.240	5.813	11.054
Otros Departamentos	308.312	213.231	521.542	7.732	7.997	15.729	11.886	11.482	23.368

Fuente: Encuesta Nacional Agropecuaria 2009. CCI – MADR

Bibliografía

Adega F, Chaves R, Guedes-Pinto H. 2005. Chromosome restriction enzyme digestion in domestic pig (*Sus scrofa*) constitutive heterochromatin arrangement. *Genes Genet. Syst.* 80, p 49-56.

Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89, 10114–10118.

Alzate M, López JB, Márquez ME. 2001. Evaluación Cariotípica de un grupo de búfalos en Fredonia, Antioquia (Colombia). *Rev. Col. Cienc. Pec.* 19(3): 291-296.

Arruga MV. 1989. Evidence of mendelian inheritance for NORs in Spanish common rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). En: *cytogenetics of animals (C.R.E. Halnan, de)*. CAB International.

Babu A. 1988. Heterogeneity of heterochromatin of human chromosome as demonstrated by restriction endonuclease treatment. En: *Heterochromatin. Molecular and structural aspects (R.S.Verma, ed)* Cambridge University Press. Cambridge.

Bella JL, Fernández JL, Gosálvez J. 1995. C-banding plus fluorochrome staining shows differences in C-, G-, and R-bands in human and mouse metaphase chromosomes. *Genome* 38: 864-868.

Betancur CA. 2006. Características que diferencian al Caballo Criollo Colombiano de algunas otras razas de equinos. En: *Revista El Caballo N° 8*. Medellín-Colombia.

Bickham JW, Baker RJ. 1979. Canalization model of chromosomal evolution. *Models and Methodologies in Evolutionary Theory*, Bull. Carnegie Mus Nat Hist 13:70-84.

Bird AP. 1987. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends in genetics*, 3:342-347.

Bowling AT, Millon L & Hughes JP. 1987. An update of chromosomal abnormalities in mares. *Journal of reproduction and fertility* 35 (suppl):149-55

Bowling AT & Millon L. 1990. Two Autosomal trisomies in the Horse: 64, XX,-26+t(26q26q) and 65, XX,+30. *Genome* 33:579-82.

Bowling AT, Breen M, Chowdhary B, Hirota K, Lear T, Millon LV, Ponce de Leon FA, Raudsepp T, Stranzinger G. (Committee). 1997. International System for Cytogenetic Nomenclature of the Domestic Horse ISCNH. Chromosome research 5:433-443.

Bravo D. 2001. Caballo colombiano, ciencia y arte. Primera ed. Medellín. 362.

Breen MC, Langford F, Carter NPF, Fischer E, Marti E, Gerstenberg C, Allen WR, Lears TL, Binns MM. 1997. Detection of Equine X Chromosome Abnormalities in Equids Using a Horse X Whole Chromosome Paint Probe (WCPP). The veterinary journal. 153: 235-238.

Brown D. 1966. The nucleolus and synthesis of ribosomal RNA during oogenesis and embryogenesis. Natn. Cancer Inst. Monogr. 23, 297-309.

Bugno M, Klukowska J, Slota Ewa, Tischner M, Switonski M. 2003. A Sporadic case of the sex-reversed mare (64, XY; SRY-negative): molecular and cytogenetic studies of the Y chromosome. Theriogenology 59:1597-1603.

Builes D, Loaiza I, López JB. 2004. Evidencia de estructuración cromosómica asociada con la distribución geográfica de pecarí de collar (*Tayassu tajacu*) de Centro y Suramérica. Pp. 152-157. En: Memorias: Manejo de Fauna silvestre en Amazonia y Latinoamérica. Iquitos-Perú.

Burkholder G. 1989. Morphological and biochemical effects of endonucleases on isolated mammalian chromosomes in vitro. Chromosoma. 97: 347-355.

Camargo M & Cervenka J. 1980. Patterns of chromosomal replication in synchronized lymphocytes. 1.evaluation and application of Metotexate block. Hum. Genet. 54: 47-53.

Camargo M & Cervenka J. 1982. Patterns of DNA replication of human chromosomes. II. Replication map and replication model. Am J Hum Genet 34:757-780.

Cribiu EP. 1981. Localisation des organisateurs nucléolaires dans les chromosomes du cheval domestique (*Equus caballus*). Ann. Génét. Sél. Anim. 13(2): 177-180.

Curotto de Lafaille, MA., Lafaille, JJ. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor Immunity 30, 626–635.

De Lorenzi, L, Genualdo V, Iannuzzi A, Di Meo GP, Perucatti A, Mancuso R, Russo M, Di Berardino D, Parma P, Iannuzzi L. 2010. Cytogenetic and genetic studies in a hypospadiac horse (*Equus caballus*, 2n=64).

Delany ME. & Bloom SE. 1993. The effect of nucleolar-size and ribosomal RNA gene copy number variation on the development of the chick embryo. Proceedings of the 8th North American Colloquium on Domestic Animal Cytogenetics and Gene Mapping, Guelph, Canada; 103 -105.

Egozcue J, Caballín, MR, Goday C. 1973. Banding patterns of the chromosomes of man and the chimpanzee” *Humangenetik* 18:77-80.

Fleming E & Martin-DeLeon P. 1981. Familial silver staining patterns of human nucleolus organizer regions (NORs). *Am J Hum Genet* 33: 67-76.

García HF. 2001. Evolución cromosómica en simiiformes: homologías, reorganizaciones y heterocromatina. Tesis de doctorado en Biología. Universitat Autònoma de Barcelona.

Genero ER. 2001. Caracterización citogenético del Ganado bovino criollo argentino (*Bos taurus*, L.) Escuela técnica superior de ingenieros agrónomos y de montes. Universidad de Córdoba, Argentina. 178 pp

Goodpasture C. & Bloom SE. 1975. Visualization of nucleolar Organizer Regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chomosoma (Berl)*, 53: 37-50.

Groves CP & Ryder OA. 2000. Systematics and Phylogeny of the horse. In: *The Genetics of the Horse*. CABI Publishing. New York. 24pp.

Guarente L. 1997a. Chromatin and ageing in yeast and in mammals. *Ciba Found. Symp.*, 211, 104–107; discussion 107–111.

Guarente L. 1997b. Link between aging and the nucleolus. *Genes Dev.* 11, 2449–2455.

Hare, W. C. D., Singh, E. L. 1979. Cytogenetics in animal reproduction. Commonwealth Agric. Bureaux, Slough, England, 96 pp.

Henao F, Gómez G, Villa F, Uribe C. 2002. Estudio citogenético de una yegua mestiza estéril. *Rev. MVZ* vol. 4 (1):28-33.

Hermesen J. 1997. *Enciclopédia dos cavalos*. Livros e Livros, Lisboa, 312pp.

Hillis D, Moritz, C & Mable B. 1996. Molecular systematic. 2a ed. Sunderland; sinauer associates, 655 pp

Hofheinz E. 2007. Estudo da variabilidade genética em quatro raças brasileiras de cavalos (*Equus caballus-Equidae*) utilizando marcadores microssatélites. Programa de pós-graduação em genética e biologia molecular. Instituto de biociencias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Infante J. 2008. Caracterización Estructural de las Explotaciones Equinas de Carne del Pirineo Catalán. Caracterización Morfológica de la Raza: Caballo Pirenaico Catalán. Unidad de Genética y Mejora Animal, departamento de ciencia animal y de los alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra.

Jiménez LM. 1996. Frecuencia de Anomalías Cromosómicas en Equinos Colombianos. Posgrados en Salud y Producción Animal. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Jiménez LM, Ariza MF. 2005. El Caballo Criollo Colombiano Patrimonio Genético Nacional. Revista oficial del gremio Fedequinas ISS: 0122-509X. 38: 10-16.

Kelly L, Postiglioni A, de Andrés DF, Vega-Plá JL, Gagliardi R, Biagetti R, Franco J. 2002. Genetic characterisation of the Uruguayan Creole horse and analysis of relationships among horse breeds. Research in Veterinary Science, 72, 69-73.

Kennedy BK, Gotta M, Sinclair DA, Mills K, McNabb DS, Murthy M, Pak SM, Laroche T, Gasser SM, Guarente L. 1997. Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S. cerevisiae*. Cell, 89, 381–391.

Klunder LR, McFeely RA, Beech J, McClune W & Bilinski WF. 1989. Autosomal trisomy in a Standardbred colt. Equine veterinary journal 21:69-70.

Knopp E, Mayr B, Czaker R, Schleger W. 1981. Nucleolus organizer regions in the chromosomes of the domestic horse. J Hered; 72:357– 8.

Kopp E, Mayr B. and Shleger W. 1983. Nucleolus organizer regions in the chromosomes of the donkey. The Journal of Hered. 74: 387-388.

Lacadena JR. 1996. Citogenética 1ª edición. Ed. Universidad Complutense. Madrid.

Lear TL. 2009. Assessing Chromosome Abnormalities in Horses with Infertility or Congenital Abnormalities. University of Kentucky, Lexington, KY, USA. Abstracts 29, 5:316-317

Leitão A, Chaves R, Batista FM, Santos S, Guedes-Pinto H, Boudry P. 2007. Cytogenetic characterisation of *Crassostrea gigas* x *C. angulata* F1 hybrids: restriction enzyme digestion chromosome banding and comparison of the aneuploidy levels of the two taxa and their hybrids. *Aquaculture* 272S1. S238-S321. Abstract

Lewin B. 1985. System that safeguard DNA. En: *Genes II*. (J. Wiley and sons, de.). reverté, S.A Barcelona.

Long SE. 1989. Chromosome analysis and infertility in the horse: analysis of laboratory results 1985- march 1989. North American Colloquium on Cytogenetics of domestic animals. 6th, Purdue.

López JB, Márquez ME, Hoyos D. 1997. Cariotipo citogenético de la guagua (*Agouti paca*). *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 50(2): 5-18.

López Ortiz JB. 1992. Efecto Genotóxico del antitumoral 5 fluoracilo. Universidad de Antioquia, departamento de Biología. Medellín.

López Ortiz JB. Márquez Fernández ME. 2002. Modelo experimental para el estudio cromosómico en células de mamífero. Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. 127 pág.

Lui JF, Giannoni MA, Giannoni ML, Tosta P A. 1990. Characteristics of NOR-Banded Chromosomes of Mangalarga Horses. *Rev. Brasil. Genet.* 13: 2. 269-281.

Martínez-Lage A, González-Tizón A, Ausió J, Méndez J. 1996. Karyotypes and Ag-NORs of the mussels *Mytilus californianus* and *M. trossulus* from the Pacific Canadian coast. *Aquaculture* 153. P 239-249.

Mayr B, Schleger W, Auer H. 1987. Frecuences of ag-NORs in the chromosomes of the cattle. *J. Hered.*, 78:206-207.

McFeely RA. 1990. Domestic Animal Cytogenetics. *Advances in Veterinary Science and comparative medicine.* 34:131-167.

- McGuire TC, Poppie MJ, Banks KL. 1974 Combined (B- and T-lymphocyte) immunodeficiency: A fatal genetic disease in Arabian foals. *J Am Vet Med Assoc*; 164: 70-76.
- Mezzanotte R, Ferrucci L, Vanni R, Summer AT. 1985. Some factors affecting the action of restriction endonucleases on human metaphase chromosomes. *Exp. Cell. Res.* 161: 247-253.
- Miller OJ, Miller DA, Dev VG, Tantarvahi, Croce RM. 1976. Expression of human, and supresión of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cells hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:4531-4535.
- Moncaleano JS, Jiménez L, Sánchez CA. 2007. Mosaicismo leucocitario asociado a infertilidad en cuatro yeguas. Universidad de los Llanos. Villavicencio, Colombia. *Orinoquia* 11, 001 87-91.
- Moreno F, Builes JP, Cadavid JD 2008. Evaluación de 30 parámetros hemáticos en bovinos *Bos indicus* en los municipios de San Juan de Uraba y Arboletes del Uraba Antioqueño. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad CES. Medellín
- Nossal GJV. 1993 Sistema inmunitario: entre la vida y la muerte. *Investigación y Ciencia*; 206:8-17.
- Oppenheim JJ & Goldstein G. 1968. Enhanced thymic lymphocyte response to phytohaemagglutinin in experimental autoimmune thymitis. *Fed. Proc.* 27, 21.
- Pereira ML, Lui JF, de Oliveira JV. 2005. Citogenética de jumentos da raza Marchadora Brasileira. *Pesq. Agropec. Bras. Brasília* 40, 2: 179-182.
- Philips SM & Zweiman B. 1970. Characteristics of the in vitro response of guinea pig blood lymphocytes to PHA and antigen. *J Immunol.* 105(1):204-14.
- Power MM. 1987. Equine half sibs with an unbalanced X:15 translocation or trisomy 28. *Cytogenetics and cell genetics* 45:163-8.
- Power MM. 1990. Chromosomes of the horse. *Advances in veterinary science and companion medicine.* 34:131-67.
- Puentes MJ 2000. Citogenética de la Biodiversidad Animal. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Bogotá.

Raudsepp T, Christensen K, Chowdhar BP. 2000. Cytogenetics of donkey chromosomes: nomenclature proposal based on GTG-banded chromosomes and depiction of NORs and telomeric sites. *Chromosome Res.* 8, 659–670.

Richer CL, Power MM, Klunder LR, McFeely RA & Kent MG. 1990. Standard Karyotype of the Domestic Horse (*Equus Caballus*). *Hereditas* 112, 289-93.

Rieger R, Michaelis A & Green MM 1976. *Glossary of Genetics: Classical and Molecular* 4^a edition. Ed: Springer- Verlag. Berlin.

Ritossa FM & Spiegelman S. 1965. Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 53, 737-744.

Rodríguez A. 2009. Estudio Citogenético de dos poblaciones porcinas: efecto de las alteraciones cromosómicas sobre los parámetros reproductivos, Facultad de Veterinaria Departamento de Medicina y Cirugía animal. Universidad Complutense de Madrid. ISBN: 978-84-692-2769-5.

Ronne M, Gyldenholm CO. 1993. The RBG Banded Karyotype of *Equus caballus* at the 525 band stage. *Hereditas* 118: 195-199.

Rosete M, Padros M, Vindrola O. 2007. El nucléolo como un regulador del envejecimiento celular. *Medicina* ISSN 0025-7680. 67: 183-194.

Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971.

Silver C. 2000. *Tudo sobre cavalos*. Editora Martins Fontes. Sao Paulo, 231pp.

Sistema de Información de la oferta agropecuaria, forestal, pesquera y acuícola. Encuesta Nacional Agropecuaria 2009. Corporación Colombia Internacional

Slota E, Wnuk M, Bugno M, Pienkowska-Schelling A, Schelling C, Bratus A, Kotylak Z. 2007. The mechanisms determining the nucleolar-organizing regions inactivation of domestic horse chromosomes. *J. Anim. Breed. Genet.* 124 163-171.

Svetlana D, Loginova J, Parada R, Chiryaeva O, Smirnov A, Kazimierzjaszczac. 1998. The comparative analysis of NOR polymorphism detected by FISH and Ag-staining on horse chromosomes. *Caryología* vol. 51, n. 1: 1-11.

Tizard I. 1992 Veterinary Immunology. 4ªEd. WB Saunders Company: Philadelphia.

Trigo FJ, Poumian AM. y otros. 1993. Patología General Veterinaria. Interamericana McGraw-Hill 2 ed.. Univ. Nac. Autónoma de México, Fac. de Med. Vet. y Zoot., México.

Ureña L, López JB. 2010. Caracterización Citogenética por bandas R-replicas de la Guagua de cola *Dynomis branickii*. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 63(1): 5355-5362.

Varley JM. 1977. Patterns of silver staining of human chromosomes. Chromosoma 61:207- 214.

Wallace H & Birnstiel M. 1966. Ribosomal cistrons and the nucleolar organizer. Biochim. Biophys. Acta 114, 296-310.

Wnuk M, Villagómez d, Bugno-Poniewierska M, Tumidajewicz P, Carter T, Słota E. 2012. Nucleolar organizer regions (NORs) distribution and behavior in spermatozoa and meiotic cells of the horse (*Equus caballus*).